Glutamatdehydrogenase des Flußkrebses ORCONECTES LIMOSUS: Reinigung und Charakterisierung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jens Beyer
aus Berlin

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546511_0084

Glutamatdehydrogenase des Flußkrebses ORCONECTES LIMOSUS: Reinigung und Charakterisierung

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jens Beyer

aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1.Referent: Prof. Dr. K. URICH
2.Referent: Prof. Dr. R. KELLER
Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1970

Aushändigung d. Prom.-Urk.: 11.12.70

Diese Arbeit wurde im II. Zoologischen Institut der Freien Universität unter der Leitung von Herrn Professor Dr. K. Urich angefertigt. Ihm danke ich für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen, klärende Diskussionen zur Ausführung der Experimente und der Anleitung zur kritischen Abfassung dieser Arbeit.

Die Experimente wurden unter Verwendung von Leihgaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Urich durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGEN	1
EINLEITUNG	2
MATERIAL UND METHODEN	5
1. Tiermaterial	5
2. Reagenzien	5
3. Bestimmung der GDH	5
4. Bestimmung der Phenoloxidase	6
5. Proteinbestimmung	6
6. Isolation von Mitochondrien aus Kiemen	7
7. Extraktion der GDH aus isolierten Mitochondrien	7
8. Direkte Extraktion der GDH aus Kiemen	7
9. Ammonsulfatfällung	8
10. Gelchromatographie	8
11. Ionenaustauscherchromatographie	9
12. Elektrophorese	9
13. Elektrofokussierung	10
ERGEBNISSE UND DISKUSSION	11
1. Isolierung der GDH	11
a) Erste Reinigung der GDH und Phenoloxidaseeffekte	11
b) Zweite Reinigung der GDH	17
2. Stabilität der GDH	20
3. Lokalisation in der Zelle	22
4. Elektrophoretische Untersuchung	22
5. Molekulargewichtsbestimmung	24

Seite

6. Kinetik 27

7. Substratspezifität 41

a) Aminosäuren 41

b) Coenzyme 45

8. Aktivierung und Hemmung 46

SCHLUSSBETRACHTUNG 50

ZUSAMMENFASSUNG 52

LITERATURVERZEICHNIS 54

Lebenslauf 66

ABKÜRZUNGEN

ADP = Adenosin-5-diphosphat

AMP = Adenosin-5-monophosphat

ATP = Adenosin-5-triphosphat

Cycl.3'5'AMP = cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat

DEAE-Cellulose = Diäthylaminoäthylcellulose

EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure

GDH = Glutamatdehydrogenase

GDP = Guanosin-5-diphosphat

GMP = Guanosin-5-monophosphat

GTP = Guanosin-5-triphosphat

5-HT = 5-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat

K = Michaeliskonstante

K_i = Hemmkonstante

NAD^+, NADH = oxidiertes bzw. reduziertes Nicotinsäureamid-adenosindinucleotid

$NADP^+$, NADPH = oxidiertes bzw. reduziertes Nicotinsäureamid-adenosindinucleotidphosphat

Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

EINLEITUNG

Die Glutaminsäure ist eine Substanz, die im Organismus vielseitig umgesetzt wird (Abb.1). In ihr berühren sich der Aminosäurestoffwechsel, der Zitronensäurezyklus und der Stickstoffstoffwechsel.

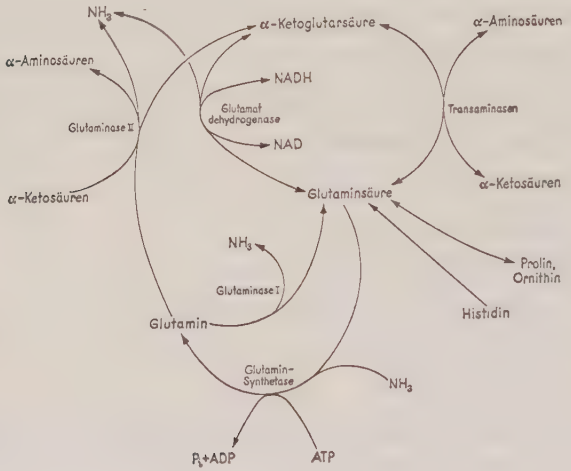

Abb. 1: Stoffwechselreaktionen der Glutaminsäure (LEUTHARDT 1963)

An dieser Stelle ist eine Regulation der Reaktionswege notwendig, die unter anderem von der Glutamatdehydrogenase [EC 1.4.1.3 L-Glutamat: NAD(P)-oxidoreductase (desaminierend)] vollführt werden kann. Dieses Enzym verbindet den Aminosäurestoffwechsel mit dem Zitronensäurezyklus. Es zeigt bei den Tieren allosterische Eigenschaften (TALAL und TOMKINS 1964; FRIEDEN 1965). Aus ihrer Stellung im Stoffwechselgeschehen erhält diese Dehydrogenase eine besondere Bedeutung bei den Krebsen. So konnte URICH (1967) zeigen, daß die GDH-Aktivität in den Organen des Flußkrebses trotz einer 50fach geringeren Energiewechselintensität

in der gleichen Größenordnung liegt wie die in der Maus und der Ratte. Aus einer Arbeit von SPECK und URICH (1969) ergibt sich, daß radioaktiv markierte Glucose und markiertes Palmitat bis zu 60% in Aminosäuren eingebaut werden und daß Glutamat schneller veratmet wird als Palmitat und Glucose. Es ist daraus zu vermuten, daß der Energiewechsel des Krebses zum großen Teil über Aminosäuren als Zwischenprodukt verläuft. Außerdem ist der Aminosäurestoffwechsel wichtig für die intrazelluläre isosmotische Regulation (CHAPLIN et al. 1966; POTTS und PARRY 1964). Eine entscheidende Rolle soll dabei nach CHAPLIN et al. (1965), SCHOFFENIELS (1965,1966) und FLORKIN und SCHOFFENIELS (1969) der Glutamatdehydrogenase zukommen, deren Aktivität beim Krebs, allerdings auch beim Rind, durch Ionen beeinflußt wird.

Im Rahmen eines am hiesigen Institut durchgeführten Arbeitsprogramms zur speziellen Biochemie der Crustaceen (URICH 1968) wird die Glutamatdehydrogenase in der vorliegenden Arbeit unter dem Gesichtspunkt, inwieweit sie die ihr im Krebs zugeschriebenen Funktionen erfüllen kann, an einem gereinigten Präparat untersucht.

Erstmals ist die GDH intensiv an einem gereinigten Präparat aus der Rinderleber von OLSON und ANFINSEN (1952, 1953) untersucht worden. Der Nachweis einer von der Proteinkonzentration abhängigen Dissoziation hat die eingehende Untersuchung dieses Enzyms in seinen Reaktionseigenschaften und GDH verschiedener Herkunft veranlaßt. Bisher liegen vergleichende Untersuchungen vor an der GDH aus der Hühnerleber (SNOKE 1956; ANDERSON und JOHNSON 1969), aus dem Rinderherzen und der Rinderleber (FRIEDEN 1959a,b ; 1963a,b), der Rattenleber (TAGER und PAPA 1965; SEDGWICK und FRIEDEN 1968), der Haileber (CORMAN et al. 1967; CORMAN und KAPLAN 1967), der Froschleber (FAHIEN et al. 1965 a,b; WIGGERT und COHEN 1965,1966), der Menschenleber (KUBO et al. 1957; LEHMANN und PFLEIDERER 1969), von Drosophila (BOND und SANG 1968), vergleichend von Wirbeltieren und Pflanzen (FRIEDEN 1965), von einigen Pflanzen wie dem Mais

(BULEN 1956), Chlorella (SHATILOV et al. 1969), Fusarium (SANWAL 1961), Blastocladiella (LéJOHN 1968; LéJOHN et al. 1969) und Neurospora crassa (SANWAL und LATA 1961/62, 1962a,b; BARRATT und STRICKLAND 1963) und von Bakterien wie Thiobacillus (LéJOHN et al. 1968) und Escherichia coli (FRIEDEN 1965). Den GDH aus tierischen Quellen ist gemeinsam, daß sie sowohl mit NAD als auch mit NADP als Coenzym reagieren und daß sie durch Purinnucleotide beeinflußbar sind. Außerdem können diese Nucleotide und hohe Verdünnungen bei der GDH vom Huhn (FRIEDEN 1962b; ANDERSON und JOHNSON 1969), Rind (FRIEDEN 1959a,1963a; TOMKINS und YIELDING 1961; TOMKINS et al. 1961), Frosch (FAHIEN et al. 1965a) und dem Menschen (LEHMANN und PFLEIDERER 1969) eine Veränderung des Molekulargewichts bewirken. Bei der Ratte (SEDGWICK und FRIEDEN 1968) und dem Hai (CORMAN et al. 1967) war dieser Effekt nicht zu finden.

Trotz aller genannten Befunde gibt es bisher keinen Beweis dafür, daß diese Veränderungen an der GDH auch im Tier tatsächlich zur Regulation des Stoffwechsels eingesetzt werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Als Versuchsobjekt diente der Flußkrebs Orconectes limosus RAFINESQUE (= Cambarus affinis SAY). Die Tiere stammten aus der Havel in Berlin-Spandau. Zur Präparation wurden immer Frühsommertiere beiderlei Geschlechts verwendet, die sich stark streuend aus C_4-, D- und B-Stadien (DRACH 1939) zusammensetzten.

2. Die verwendeten Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Mannheim (Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, α-Ketoglutarat, die Adenosin-5-phosphate und Guanosin-5-phosphate, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH, Uridin-5'-diphospho-N-acetylglucosamin), Merck, Darmstadt (Triäthanolaminhydrochlorid, L-Glutaminsäure, Tris, 5-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat, Rinderserumalbumin 100% rein, L-Asparaginsäure, L-Asparagin), Serva, Heidelberg (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, Phenazinmethosulfat, cyclisches 3'5'AMP, Glycin, D,L-Norvalin), Fluka, Buchs,Schweiz (D,L-Tyrosin, L-Leucin, L-Norleucin, L-Isoleucin, L-Lysin) und Sigma, St.Louis, USA (D,L-Valin).

3. Die Bestimmung der Glutamatdehydrogenase erfolgte nach der Methode von WARBURG und CHRISTIAN (1936) im optischen Test. Der Reaktionsverlauf wurde bei 366 nm im Eppendorf-Photometer (Firma Netheler & Hinz, Hamburg) mit auf 25°C temperiertem Küvettenhalter gemessen und mittels eines Phillips-Kompensationsschreibers mit Linearisierungseinheit (Netheler & Hinz) als Extinktionsänderung registriert. Als Standardtest zur Verfolgung der Reinigung wurde die Glutamatbildung gemessen. Der Testansatz zeigte in Anlehnung an SCHMIDT (in BERGMEYER 1962) und URICH (1967) folgende Endkonzentrationen in 1,07 ml Gesamtvolumen: 45 mM Triäthanolaminhydrochlorid/NaOH-Puffer pH 8,2 mit 9 mg/ml Rinderserumalbumin, 300 mM Ammoniumacetat, 20 mM α-Ketoglutarat, 0,24 mM NADH

und 10-30 µl Gewebsextrakt. Der Testansatz zur Verfolgung der Gegenreaktion, des Glutamatabbaus, enthielt folgende Konzentrationen in 1 ml Gesamtvolumen: 40 mM Triäthanolaminhydrochlorid/NaOH-Puffer pH 8,2 mit 8 mg/ml Rinderserumalbumin, 20 mM L-Glutamat, 0,27 mM NAD^+ und 10-30 µl Gewebsextrakt.

4. Die Phenoloxidase wurde nach GRAUBARD und NELSON (1935 a und b) im Warburg-Gerät (Mikrowarburg der Fa. Braun, Melsungen) bestimmt. Die Substratlösung enthielt 11 mM D,L-Tyrosin, 100 mM $CaCl_2$ und 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Kupferionen wurden als 2% $CuSO_4 \cdot 4H_2O$-Lösung zugegeben, die mit Tris auf pH 7,5 eingestellt war. Die Mikrowarburggeräte wurden, wie folgt, zur Messung vorbereitet: In das Mittelgefäß kamen 20 µl 6 M KOH, in das Gefäß 100 µl Enzym mit ungefähr 250 µg Protein, in den Seitenarm 100 µl Substrat- und 50 µl Kupfersalzlösung. Als Gasphase wurde Sauerstoff verwendet. Die Gefäße wurden unter ständigem Schütteln in einem Wasserbad auf 37°C temperiert.

5. Die Proteinbestimmung wurde nach LOWRY et al. (1951) mit dem Reagenz nach FOLIN-CIOCALTEAU (Fa. Merck) durchgeführt. Die der festgestellten Extinktion bei 750 nm entsprechende Proteinmenge wurde einer für kristallines Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve entnommen. Für die Proteinbestimmung in elektrophoretisch erzeugten Banden auf Polyacrylamidgelen fand eine Relativmethode Verwendung. Dabei wurde die auf das Gel aufgebrachte Menge durch die vorstehende Methode bestimmt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in standardisierter Weise nach ABRAHAM et al. (1970) mit Amidoschwarz 10B gefärbt und differenziert. Anschließend zeichnete ein Eppendorf-Photometer mit Pherogrammauswerter und angeschlossenem Phillips-Schreiber mit zwischengeschaltetem Kompensationsteil den Extinktionsverlauf der Trennung bei 546 nm auf. Nach HOFFMEISTER (persönliche Mitteilung) ist die in einer Bande enthaltene Proteinmenge der Extinktion

proportional, solange die gemessene Extinktion unter 2 bleibt. Unter Einhaltung dieser Bedingungen ergab sich aus dem Verhältnis der Fläche des gesamten Pherogramms zu der Fläche der zu untersuchenden Bande der Reinheitsgrad der Bande unter der Voraussetzung, daß keine Absorptionsunterschiede für Amidoschwarz bei den verschiedenen Proteinbanden auftraten. Aus der Kenntnis der aufgebrachten Proteinmenge ließ sich der erhaltene Relativwert in eine Proteinmenge umrechnen.

6. Isolierung von Mitochondrien (nach VAN DEN BERGH 1967). Nach Durchschneiden des Unterschlundganglions wurden die Kiemen sofort aus den Krebsen isoliert und auf Filterpapier kurz abgetrocknet. Jeweils 10 g Kieme wurden in 40 ml eines auf pH 7,5 eingestellten Mediums mit 50 mM Tris und 2,5 mM EDTA unter Zusatz von 150 mM KCl in einem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator mit Teflonstempel homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 10 min Zentrifugation bei 600 g von groben Partikeln befreit, durch ein mit Watte überschichtetes Perlonnetz geseiht und der erhaltene Rohextrakt 20 min bei 12 000 g zentrifugiert. Das Präcipitat, das die Enzymaktivität enthielt, wurde bei -30°C eingefroren.

7. Extraktion der GDH aus Mitochondrien. Die nach der Isolierung tiefgefrorenen Mitochondrien wurden aufgetaut und im dreifachen Volumen 2,5 mM EDTA pH 7,5 dadurch extrahiert, daß diese Suspension 2 min scharf mit dem Ultra Turrax (Fa. Janke & Kunkel, Staufen i.Br.) homogenisiert wurde. Nach 20 min Zentrifugation bei 25 000 g wurde das Sediment weitere vier Male auf diese Weise behandelt.

8. Direkte Extraktion von GDH aus Kiemen. a) 10 g Kieme wurden in 40 ml eines auf pH 7,5 eingestellten Mediums mit 50 mM Tris und 2,5 mM EDTA 2 min scharf mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 25 000 g wurde diese Extraktion dreimal wiederholt.-

b) Jeweils 150 Kiemenbüschelpaare wurden schnell von Tieren entnommen, die direkt vorher durch Zerschneiden des Unterschlundganglions getötet worden waren, auf Filterpapier abgetrocknet und 10 min an einer Wasserstrahlpumpe entgast. Dann wurde in einem mit HCl auf pH 7,5 eingestellten Medium mit 50 mM NaCN und 2 mM EDTA scharf mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 25 000 g zentrifugiert und der Überstand sofort mit 50% Ammonsulfat gesättigt. Die Extraktion wurde dreimal wiederholt.

9. Fraktionierte Ammonsulfatfällung. a) Fällung aus Mitochondrienextrakten. Bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 und 1,5 mg/ml und einem pH zwischen 7,5 und 7,8 wurde in dem Bereich zwischen 35% und 50% Ammonsulfatsättigung die beste Reinigung bei guter Ausbeute erhalten. Die notwendigen Ammonsulfatmengen wurden nach dem Nomogramm von DI JESO (1968) bestimmt und in fester Form zugegeben. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH 8,5 konstant gehalten; die Fällungstemperatur betrug immer 4°C. Die Ansätze wurden vor dem Zentrifugieren mindestens 12 h bei 4°C aufgehoben.- b) Fällung von Totalhomogenaten. Der 1,5 - 2 mg Protein/ml enthaltende Überstand war direkt nach der Extraktion zu 50% mit Ammonsulfat gesättigt worden. Nach ungefähr vierwöchigem Stehen in der Kälte wurde das Sediment abzentrifugiert und dreimal in einem Zehntel des Ausgangsvolumens 50 mM Tris/HCl mit 20 mM NaCN und 30% Ammonsulfat bei pH 7,5 extrahiert. In dem Extrakt, in dem die Proteinkonzentration 1,2 mg/ml betrug, wurde die Ammonsulfatkonzentration auf 40% angehoben und das nach 12 h Stehen ausgefallene Sediment nach Zentrifugation mit 25 000 g verworfen. Die im Überstand enthaltene Aktivität konnte mit einer weiteren Erhöhung der Ammonsulfatkonzentration auf 50% ausgefällt und in diesem Zustand ein halbes Jahr ohne deutlichen Aktivitätsverlust gelagert werden.

10. Gelfiltration. Als Trenngel wurde das Agarosegel Sepha-

rose 4B der Firma Pharmacia/Uppsala (Schweden) benutzt. Zu analytischen Zwecken fand eine 100 cm x 1,3 cm große Säule mit Kühlmantel Verwendung, zur präparativen Anreicherung eine solche von 100 cm x 2,5 cm. Die Füllung der Chromatographierohre erfolgte nach der von DETERMANN (1967) angegebenen Methode. Eluiert wurde mit 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Mit einem LKB Uvicord I mit angeschlossenem Schreiber wurde kontinuierlich die Lichtdurchlässigkeit des Eluats bei 254 nm verfolgt. Die Durchflußgeschwindigkeit lag bei 3-4 ml/cm^2 Säulenquerschnitt x h. Die Fraktionierung erfolgte mit dem LKB Radirac bei einer Arbeitstemperatur von 4°C.

11. Ionenaustauscherchromatographie. Benutzt wurde die Diäthylaminoäthylcellulose-SH der Fa. Serva/Heidelberg. Als Äquilibrierungspuffer dienten 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 50 mM KCl, in dem auch das Untersuchungsmaterial als 20 000 g-Überstand aufgebracht wurde. 10-15 mg Protein pro Gramm trockene DEAE-Cellulose wurden als Lösung von 1 mg/ml auf die Säule gegeben; es wurde mit einer Menge Puffer nachgewaschen, die dem zehnfachen Gelbettvolumen entsprach. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 50 bis 600 mM KCl in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5, der mit Hilfe zweier verbundener Zylinder erhalten wurde (RYBáK et al. 1966). Die pH-Bestimmung erfolgte in den Fraktionen mit der Schott-Einstabelektrode U9255/2 am Meßverstärker Knick pH 71. Das Elutionsvolumen wurde bei einem Säulenverhältnis von Länge/Durchmesser um 10/1 bis 7/1 so gewählt, daß die Salzkonzentration pro cm^2 Säulenquerschnitt und ml Elutionslösung sich um 1 mM KCl änderte. Die Salzkonzentration wurde in dem Zeiss-Photometer PMQ II als Kaliumionen flammenphotometrisch bestimmt. Die weiteren methodischen Daten entsprachen denen bei der Gelchromatographie.

12. Die Elektrophorese wurde nach ABRAHAM et al. (1970) als kontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese durchge-

führt. Dieses System wurde auch zur präparativen Reinigung der GDH verwendet. Aufgetragen wurden zwischen 50 und 150 µg Protein. Auf Protein wurde nach WIEME und RABAEY (1957) mit 1% Amidoschwarz 10B in 7% Essigsäure 10 min gefärbt und 48 h mit zweimal 150 ml 7% Essigsäure differenziert. Die GDH-spezifische Anfärbung wurde unter Zugrundelegung des von DIETZ und LUBRANO (1967) für Lactatdehydrogenase entwickelten Systems mit folgenden Reagenzien erzeugt: Glutaminsäure/NaOH 1 M pH 8,2; NAD^+ 6,8 x 10^{-3} M; Nitroblau-Tetrazoliumchlorid 2,5 g/l; Phenazinmethosulfat 2 g/l; Triäthanolaminhydrochlorid/NaOH-Puffer 100 mM pH 8,2. Diese Stammlösungen wurden wöchentlich erneuert. Für Färbungen wurden sie in folgendem Verhältnis gemischt: 1:1:1:0,04:6. Bei 37°C betrug die Inkubationszeit 30 min.

13. Die freitragende Elektrofokussierung wurde nach der Methode von WELLER et al. (1968) durchgeführt unter der Verwendung von Ampholine pH 3-10 (LKB, Bromma,Schweden) als Trägerampholyt. Die zu analysierende Enzymlösung wurde dabei in den mittleren Bereich der Trennsäule geschichtet. Bei der trägerhaltigen Elektrofokussierung wurde als Träger ein 5% Polyacrylamidgel nach MAURER (1968, S.44, Trenngelsystem 1) mit 1% Ampholine und 20% Saccharose für den pH-Bereich von 3-6,5 verwendet, das gegen den Elektrodenpuffer mit einer gespannten Dialysiermembran abgegrenzt wurde. Auf den Träger wurde die Probe in 20% Saccharose mit 1% Ampholine aufgebracht und mit so viel 15% Saccharose in 1% Ampholinelösung überschichtet, daß der freitragende Trennbereich (pH 10-6,5) und der acrylamidhaltige (pH 6,5-3) gleich lang waren. Die Trennstrecke von pH 3 bis pH 10 betrug immer 20 cm. Als Elektrodenpuffer fand 0,09 M Phosphorsäure bzw. 0,015 M Äthylendiamin Verwendung. Die Arbeitstemperatur betrug 4°C. Eine Trennung dauerte ungefähr 24 h bei einer konstanten Spannung von 200 V und einer anfänglichen Stromstärke von 3 mA/cm^2.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Durchgeführt wurde die Isolierung der GDH in der Reihenfolge:

   Mitochondrienisolierung und -extraktion
   Fraktionierte Ammonsulfatfällung
   Ionenaustauscherchromatographie
   Gelchromatographie
   Elektrophorese

   Die erste Reinigung ging von isolierten Mitochondrien aus. Dabei traten Artefakte auf Grund von Wirkungen der Phenoloxidase auf. Es wurde daher auf den Reinigungsschritt der Elektrophorese verzichtet. Die zweite Reinigung verzichtete auf die Mitochondrienisolation, dafür wurde eine präparative Elektrophorese angeschlossen. Bei einigen Reinigungsschritten wurde das Enzym in mehrere Chargen aufgeteilt.

   a) Erste Reinigung der GDH. Aus den Kiemen von 750 Krebsen wurden die Mitochondrien isoliert. Die Extraktion der GDH aus ihnen ergab einen Wiederfund von 67% der Gesamtaktivität. Die GDH ist hierbei gegenüber einem Extrakt aus ganzen Kiemen (s.S. 7 ,Verfahren a) um den Faktor 9 angereichert. Die Notwendigkeit, für eine optimale Ausbeute die Mitochondrien mehrmals zu extrahieren, zeigt Tab. 1.

	Gesamtaktivität (U)	Gesamtprotein (mg)
1.Extraktion	204	268
2.Extraktion	138	144
3.Extraktion	86	70
4.Extraktion	40	27
5.Extraktion	22	19
Gesamt	500	517
Homogenatüberstand	245	5700

Tabelle 1 : Extraktion der GDH aus den Kiemenmitochondrien von 750 Krebsen.

Die Ammonsulfatfällung zwischen 35% und 50% Sättigung enthielt 52% der aus den Mitochondrien gelösten Aktivität bei einer Reinigung um den Faktor 3,3 (Tab. 2). Die Ausbeute könnte höher sein, wenn nicht ein beachtlicher Anteil der Aktivität ausgefallen wäre, der nicht wieder in Lösung zu bringen war.

Reinigungsstufe	Gesamtaktivität (U)	Gesamtprotein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg Protein)
Mitochondrienextrakt	500	517	0,97
Ammonsulfatfällung	260	81	3,2
DEAE-Cellulose-Chromatographie	120	6,7	18
Gelchromatographie	42	0,95	44

Tabelle 2 : Anreicherung der GDH aus isolierten Mitochondrien nach den verschiedenen Reinigungsschritten.

Beim Auftragen des 20 000 g-Überstandes auf die Ionenaustauschersäule nach der Ammonsulfatfällung fiel immernoch einige Aktivität aus. Von der Säule wurde ein geringer Teil der Enzymaktivität nicht adsorbiert. Ein weiterer Verlust an Aktivität trat bei der Elution auf, da das Enzym dabei stark verdünnt wurde. Bei Proteinkonzentrationen um 0,15 mg/ml war in 10 h eine irreversible Verringerung der Aktivität auf 1/5 zu finden. Eine pH-Verschiebung während der Elution konnte nicht festgestellt werden. Das Elugramm gibt Abb. 2 wieder. Der die Enzymaktivität enthaltende Eluatanteil wurde mit 50% Ammonsulfat gesättigt.

Das Sediment der Ammonsulfatfällung nach der Ionenaustauscherchromatographie wurde in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 auf 1,5 mg/ml Protein eingestellt und auf die Sepharose-Säule aufgetragen. Bei der Elution gab es auch hier beachtliche Aktivitätsverluste in Abhängigkeit von der Zeit bei geringen Eiweißkonzentrationen. Wurden jedoch ungefähr fünffach höhere Proteinkonzentrationen verwendet,

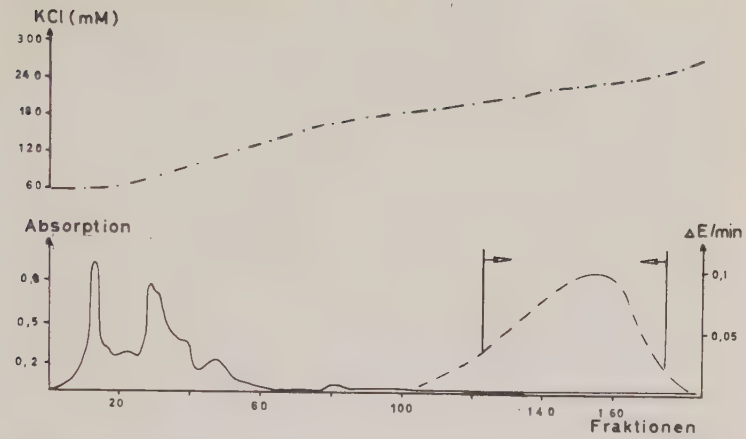

Abb.2: Reinigung der GDH aus Mitochondrien auf DEAE-Cellulose. ——— Absorption des Eluats bei 254 nm; ·–·–·– KCl-Gradient; ------ Enzymaktivität. Fraktionsgröße 10 ml/30 min.

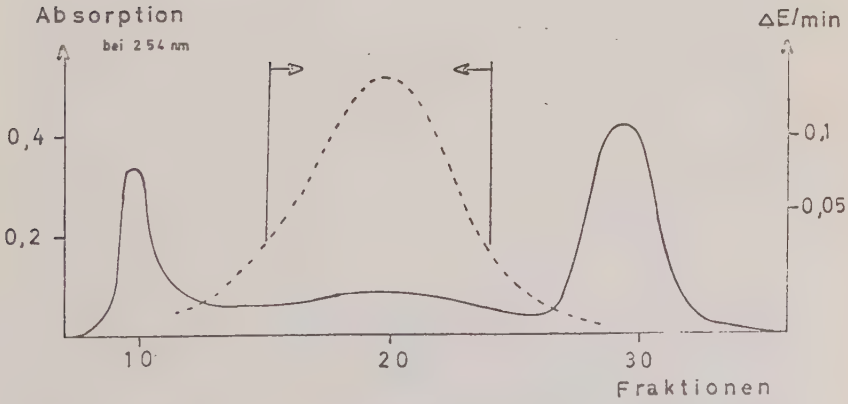

Abb.3: Reinigung der GDH aus Mitochondrien auf Sepharose 4B. ——— Absorption bei 254 nm; ----- Enzymaktivität. Fraktionsgröße 15 ml/15 min.

so ergaben sich keine Trennungen mit vergleichbarer Reinigungswirkung. Das Elugramm ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Phenoloxidase. Zweifel an der Intaktheit des aus Mitochondrien gereinigten Enzyms ergaben sich aus analytischen Untersuchungen bei der Elektrofokussierung. Hierbei zeigte das gereinigte Präparat eine große Neigung zum Ausfallen bei relativ geringen Proteinmengen von etwa 300 mg, so daß auf der freitragenden Elektrofokussierung keine genaue Festlegung des isoelektrischen Punktes möglich war. Die Störungen durch das Ausfallen des Proteins konnten in einer trägerhaltigen Apparatur umgangen werden. Es wurde nur mit einem Teilgel gearbeitet, weil das Enzym nicht unter Erhaltung der Aktivität in Polyacrylamid einpolymerisiert werden konnte. Bei dieser Methode konnte trotz der Präcipitation der GDH eine deutliche Fokussierung erreicht werden. Für den isoelektrischen Punkt ergab sich dabei ein pH von 5,9 für die in 1 ml Wasser extrahierte 0,7 cm dicke Polyacrylamidschicht mit maximaler Aktivität. In guter Übereinstimmung mit diesem Wert steht der auf Grund der Lage der Bande im Gradienten berechnete von 6,0.

Zweifel an der Intaktheit der GDH-Präparation entstanden daraus, daß das Enzym immer dunkelbraun ausfiel, nie aber weiß oder gelblich, wie man es erwartet hätte. Es war zu vermuten, daß diese Verfärbung ein Präparationsartefakt war, da frisch hergestellte Kiemenhomogenate auch in der Kälte von einer anfangs nur schwachen Braunfärbung über Nacht ein tief dunkelbraunes Aussehen bekamen. Dabei fiel ein braunes Sediment aus, das eine erhebliche Menge der Aktivität enthalten konnte; bei einem 20% Homogenat waren es nach 24 h bis zu 20%. Diese beiden Effekte, die Bräunung und das Ausfallen, traten auch nach Fällung mit 35% - 50% Ammonsulfat auf, wenngleich in verringertem Maße. Dagegen zeigten sie sich bei einer mehrfachen Extraktion von Kiemen nur in dem ersten Extrakt.

Nach DAWSON und TARPLEY (1951) könnte dafür die Phenoloxidase verantwortlich sein. Dies wurde durch Versuche unter Sauerstoffentzug wahrscheinlich gemacht. Bereitete

man Homogenate mit entgastem Puffer und entgasten Kiemen unter Stickstoff, so war der 20 000 g-Überstand nur leicht gelblich und dunkelte bei Aufbewahrung unter Stickstoff im Laufe eines Tages nur sehr wenig nach. Während dieses Zeitraums war auch nach Zentrifugation keine Sedimentation von GDH-Aktivität zu finden.

KARLSON und LIBENAU (1961) benutzten zur reversiblen Hemmung der Phenoloxidase aus Calliphora Ascorbinsäure, die auch am Krebs die beschriebenen Störeffekte verhinderte, aber gleichzeitig die GDH inaktivierte. Ließ man Sauerstoff hinzutreten, so kam mit eintretender Bräunung auch die GDH-Aktivität wieder. Die Zugabe von 7 mM ß-Mercaptoäthanol bewirkte nur eine geringe Hemmung der Enzymaktivität, verringerte aber gleichzeitig nur wenig ihr Ausfallen. Ascorbinsäure wie ß-Mercaptoäthanol haben reduzierende Wirkung; diese ist bei der Ascorbinsäure größer, weswegen sie wahrscheinlich auch den sehr verstärkten Effekt lieferte.

Phenoloxidasen werden allgemein als kupferhaltige Enzyme beschrieben, die durch Komplexbildner mit diesem Metallion reversibel inaktiviert werden (DAWSON und TARPLEY 1951). Für Versuche dazu wurden 20 000 g-Überstände von 10% Homogenaten in 50 mM Cyanid/HCl-Puffer pH 7,5 oder in wäßriger, übersättigter Phenylthioharnstofflösung (0,066 M) verwendet. Die Ergebnisse entsprachen der Erwartung: Es erfolgte keine Bräunung des Homogenats oder Sedimentation von GDH, deren Aktivität voll erhalten blieb. Zur direkten Bestimmung der Phenoloxidase wurden die mit Komplexbildnern versetzten Homogenate verwendet, um die Aktivität dieses Enzyms während der Präparationszeit zu unterdrücken. Wiederhergestellt wurde die Aktivität durch Zugabe von Kupferionen im Überschuß. Zur Entfernung von Substrat aus dem Gewebe wurde ein mit Phenylthioharnstoff gesättigtes Homogenat gegen einen mit Phenylthioharnstoff gesättigten Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert. Um zu sichern, daß die aromatischen Aminosäuren unter diesen Bedingungen dialysabel waren, wurde vor der Dialyse zu einer Kontrolle radioaktiv markiertes Tyrosin hinzugegeben. Die Ergebnisse sind in

Tab. 3 zusammengefaßt. Die angegebenen Werte stammen aus Doppelbestimmungen, deren Einzelwerte maximal fünf Prozent vom Mittel abweichen.

Hemmer		Tyrosin	Kupferionen	$\frac{\mu M\ O_2 \cdot 10^{-2}}{min \cdot mg\ Protein}$
Phenylthioharnstoff	undialysiert	+	+	1,16
		-	+	0,96
		+	-	0
		-	-	0
	dialysiert	+	+	1,06
		-	+	0,86
		+	-	0
		-	-	0
Cyanid	undialysiert	+	+	0,2
		-	+	0,16
		+	-	0,05
		-	-	0,04

Tabelle 3 : Bestimmung der Phenoloxidaseaktivität unter der Wirkung von Komplexbildnern.

Die Ergebnisse unter Verwendung von Cyanid als reversiblem Hemmer sind weniger scharf als die mit Phenylthioharnstoff. So ist der Sauerstoffverbrauch auch unter Optimalbedingungen fünffach geringer. Außerdem zeigt das Cyanidhomogenat auch ohne Zusätze einen Sauerstoffverbrauch. Insgesamt bleibt aber die mit Phenylthioharnstoff gefundene Tendenz erhalten. Die Ergebnisse der Phenoloxidasebestimmung sind folgendermaßen zu deuten: Die Aktivität des mit Kupfer reaktivierten Homogenats ist durch Zusatz von Tyrosin nur um 20% - 25% zu steigern, gleichgültig, ob das Homogenat durch Dialyse von aromatischen Aminosäuren befreit worden ist oder nicht. Es ist daher zu vermuten, daß die Enzyme, die durch Phenylthioharnstoff reversibel inaktiviert werden, auch nichtdialysable Substanzen oxidieren können. Dafür

spricht auch die Tatsache, daß im gelösten Sediment einer 60% Ammonsulfatfällung ebenfalls die Effekte der Bräunung und des Ausfallens erhalten bleiben. Die grundsätzlich ähnlichen Ergebnisse mit Cyanid zeigen, daß die die GDH schützende Wirkung des Phenylthioharnstoffs nicht auf einer spezifischen Hemmung der oxidierenden Enzyme beruht, sondern auf der Fähigkeit, Kupferionen komplex zu binden. Da die Braunfärbung und Sedimentation von GDH-Aktivität mit dem Sauerstoffzutritt und Einflüssen auf die Phenoloxidase parallel gehen, liegt der Schluß nahe, daß die Phenoloxidase auch solche aromatischen Aminosäuren oxidieren kann, die in peptidischer Bindung stehen.

KARLSON und LIEBENAU (1961) haben bei der Reinigung der o-Diphenoloxidase aus Calliphora gefunden, daß dieses Enzym nach längerem Stehen ebenfalls abzentrifugiert werden kann. Sie führen diese Tatsache darauf zurück, daß sich das Enzym mit seinen Reaktionsprodukten, den o-Chinonen, zu Aggregaten zusammenschließt. Bei den hier durchgeführten Versuchen scheint es hingegen so zu sein, daß die Chinonisierung schon an Aminosäuren vollzogen wird, die noch im Peptidverband stehen, so daß die nachfolgende Aggregation Partikel solcher Größe liefert, daß sie von allein sedimentieren.

b) Zweite Reinigung der GDH. Um eine von Phenoloxidasewirkungen freie GDH-Präparation zu erhalten, wurde erneut eine Reinigung durchgeführt. Hierbei wurde auf die Isolierung von Mitochondrien verzichtet. Die GDH wurde direkt aus den Kiemen von 750 Krebsen extrahiert unter Hemmung der Phenoloxidaseaktivität durch Cyanid. Auch hier mußte für optimale Ausbeute mehrfach extrahiert werden (Tab. 4).

	Aktivität (U)	Protein (mg)
1.Extraktion	352	5400
2.Extraktion	223	650
3.Extraktion	76	110
4.Extraktion	8	40
Gesamt	701	6200

Tabelle 4 : Extraktion der GDH-Aktivität aus Kiemen.

Bei der fraktionierten Ammonsulfatfällung wurde allen Lösungen Cyanid zugesetzt, um jeglichen Phenoloxidaseeinfluß zu verhindern. Anreicherung und Ausbeute gehen aus Tab. 5 für die Gesamtreinigung hervor.

Reinigungsstufe	Gesamt-aktivität (U)	Gesamt-Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg Protein)
Extrakt	701	6200	0,11
Ammonsulfatfällung	570	520	1,1
DEAE-Cellulose-Chromatographie	480	49	7,8
Gelchromatographie	210	10	21
Elektrophorese	66	1,3	46

Tabelle 5 :Anreicherung der GDH aus Kiemen nach den verschiedenen Reinigungsschritten.

Die Ionenaustauscher- und Gelchromatographie (Abb. 4 und 5) erfolgte genauso wie bei der ersten Reinigung. Als einziges wurde der Puffer verändert, in dem das Enzym auf den Ionenaustauscher gegeben wurde. Hier diente ein Zusatz von 20 mM Natriumcyanid der komplexen Bindung letzter Kupferionen. Zur Isolierung der GDH nach der Elektrophorese wurde stets ein Gel von insgesamt zwölf GDH-spezifisch angefärbt und nach dieser Vorlage aus den anderen Gelen die entsprechenden enzymhaltigen Blöcke herausgeschnitten. Aus den zerkleinerten Blöcken wurde das Enzym in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 unter Zugabe von 10 mg Rinderserumalbumin/ml herausgelöst. Das hierbei erhaltene Präparat ist mit seiner spezifischen Aktivität in Tab. 6 mit anderen intensiv gereinigten GDH verglichen. Dieses Präparat zeigte auf der trägerhaltigen Elektrofokussierung immer eine gelblichweiße Bande, die durch die Lage bei pH 6,1 ungefähr 0,1 pH-Einheiten weniger sauer war als die durch Phenoloxidase geschädigte Präparation.

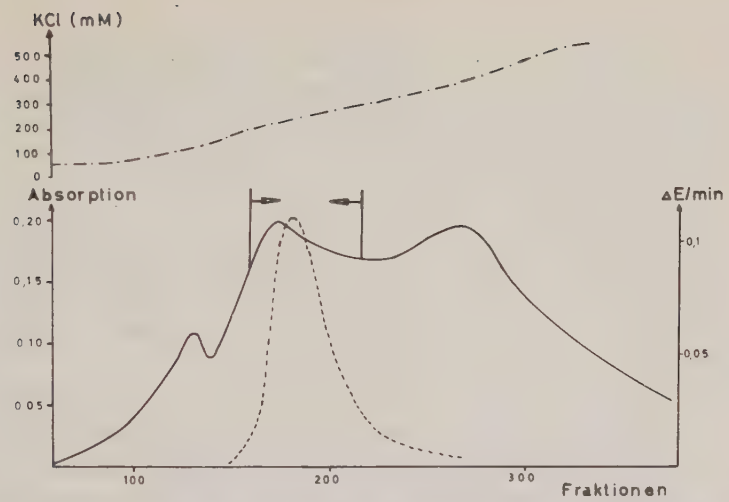

Abb.4: Reinigung der GDH an DEAE-Cellulose.——— Absorption des Eluats bei 254 nm;·-·-· KCl-Gradient; ---- Enzymaktivität. Fraktionsgröße 10 ml/20 min.

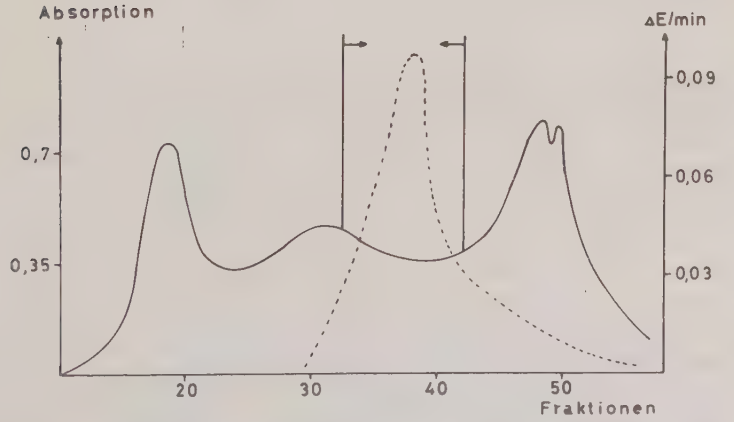

Abb.5: Elution der GDH von einer Sepharose-4B-Säule. ——— Absorption des Eluats bei 254 nm; ----- Enzymaktivität. Fraktionsgröße 8 ml/30 min.

Herkunft	Spezifische Aktivität (U/mg) mit Glutamat	mit α-Ketoglutarat
Krebs (Kieme)+)	2,1	46
Hai[1)]	3	
Frosch[2)]	25	
Kaulquappe[3)]	2,5	
Huhn[4)]	183	1350
Mensch[5)]	6,2	87
Rind	90[6)]	950[6)]
	185[7)]	

Tabelle 6 : Vergleich der spezifischen Aktivitäten von GDH verschiedener Herkunft. Bei den Wirbeltieren wurde stets das Leberenzym untersucht.

+) Standardtests; 1) CORMAN et al.(1967); 2) FAHIEN et al.(1965a); 3) WIGGERT und COHEN (1966); 4) SNOKE (1956); 5) LEHMANN und PFLEIDERER (1969); 6) OLSON und ANFINSEN (1952); 7) WALLENFELS et al.(1957), SATO (1958)

2. Stabilität der GDH. Das ungereinigte Enzym ist relativ gut haltbar. In einem 10% Homogenat liegt in optimalen Puffern der Aktivitätsverlust bei 4°C und geeignetem pH innerhalb einer Woche bei 10% (Abb.6). Bei höher konzentrierten Homogenaten ist die Inaktivierungsrate noch etwas geringer. Auf Einfrieren reagiert das Enzym, sobald es von den Mitochondrien gelöst worden ist, mit einer reversiblen Denaturierung. Nach ungefähr sechs Stunden ist es wieder maximal aktiv bei einem irreparablen Verlust von 20% bis 30% der Ausgangsaktivität. Versuche, das Enzym gefriergetrocknet aufzubewahren, liefern unreproduzierbare, widersprüchliche Ergebnisse. Deshalb ist zur Aufbewahrung immer eine mindestens 50% Ammonsulfatlösung verwendet worden, in der die Aktivität innerhalb eines halben Jahres bei 4°C nicht nachweisbar verändert wird. Das gereinigte Enzym ist sehr empfindlich

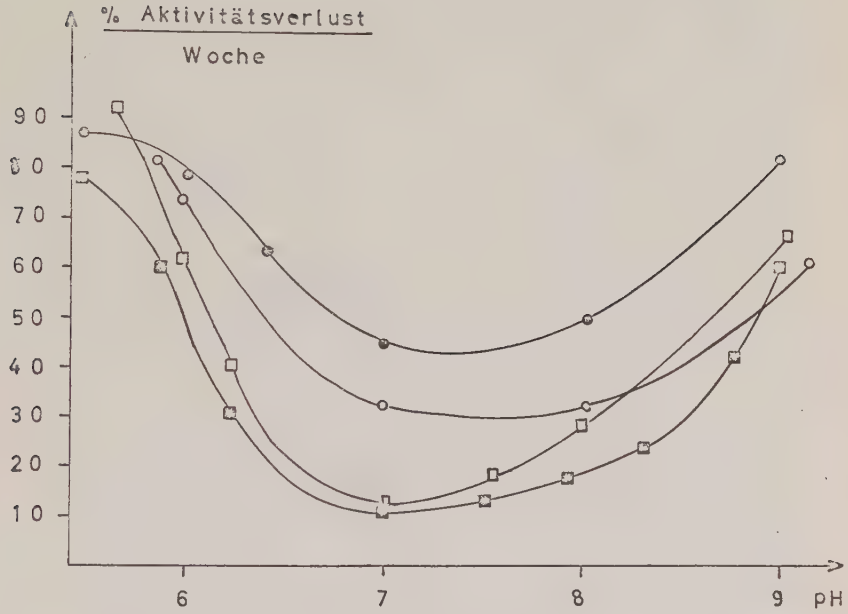

Abb.6 : Aktivitätsverlust pro Woche in Abhängigkeit vom pH in verschiedenen Puffern. (Alle Puffer 50 mM: ● Ammoniumacetat/HCl- bzw. Ammoniumacetat/NaOH-Puffer, ○ Triäthanolaminhydrochlorid/NaOH-Puffer, ■ Tris/HCl-Puffer, □ Glycylglycin/HCl-Puffer.)

bei geringen Proteinkonzentrationen. Schon nach ungefähr 70facher Reinigung ist eine sinnvolle Aktivitätsbestimmung nur unter Zusatz von Rinderserumalbumin durchzuführen, da sonst die Aktivität bei den erforderlichen hohen Verdünnungen nach 5 min Inkubationszeit nur 1/10 der mit 5 mg Rinderserumalbumin/ml erreichbaren ist. Diese Denaturierung ist zu etwa 30% irreversibel. Dem entsprechen die in der ersten

Reinigung beschriebenen Verdünnungsaktivierungen bei den Säulenchromatographien.

3. Lokalisation der GDH in der Zelle. Nach den Befunden von ZIEGLER und LINNANE (1958) am Rinderherz, DELBRÜCK et al. (1959) am Muskel und Fettkörper der Heuschrecke, der zusammenfassenden Arbeit von DE DUVE et al. (1962) und neueren Arbeiten [YOUNES et al.(1967) am Herzmuskel des Schweins; SOTTOCASA (1967) an der Rattenleber; LANDRISCINA et al.(1968a) an der Taubenleber; LANDRISCINA et al. (1968b) am Rinderhirn; ALLMAN et al.(1968) an der Rinderleber; BOND und SANG (1968) an Drosophila-Larven] ist anzunehmen, daß die GDH stets vollständig mitochondrial gebunden ist. Bei Glossina morsitans und Musca domestica soll nach MUUS (1968) allerdings das Enzym nach Homogenisation in 0,25 M Saccharose völlig löslich sein. Bei der Ratte ist nach den Befunden von DI PRISCO et al.(1968) nicht die gesamte GDH-Aktivität in den Mitochondrien lokalisiert. Ihre Ergebnisse lassen vermuten, daß etwa 25% der Gesamtaktivität in den Zellkernen lokalisiert sind als ein Protein, das durch seine Eigenschaften deutlich von dem mitochondrialen unterschieden werden kann.

Über die Lokalisation der GDH im Krebs liegt bisher die Arbeit von GRASZYNSKI (1969) vor, der mit der Methode von PETTE (1968) durch fraktionierte Extraktion von Enzymen die GDH aus Herz und Antennendrüse zu 85% mitochondrial gebunden findet. Bei der Isolierung aus Kiemen werden nur 55% bis 65% mit der hier benutzten Methode im Mitochondriensediment gefunden. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Kiemencuticula nur durch relativ rauhe Homogenisation zerstört werden kann.

4. Elektrophoretische Analyse der GDH. Rohhomogenate zeigen nach GDH-spezifischer Färbung stets zwei Banden (Abb.7). Ohne Substrat tritt keine Bandenmarkierung auf. MUUS (1968) beschreibt für Glossina und Musca und PASHEV (1967) für die Ratte im Agargel ebenfalls Doppelbandigkeit der GDH. Während MUUS keinerlei weitere Untersuchungen über die

Glaubwürdigkeit des Ergebnisses anstellt, machte PASHEV für die Ratte wahrscheinlich, daß es sich bei der langsam wandernden Bande um eine unspezifische Dehydrogenase handelt. Vielleicht ist diese Bande nach den Befunden von DI PRISCO et al. (1968) als GDH aus der Kernfraktion der Rattenleber zu deuten. Für die beim Menschen gefundenen Isozyme der GDH, die VAN DER HELM (1952) und RESSLER und STITZER (1967) beschreiben, ist nach LEHMANN und PFLEIDERER (1969) anzunehmen, daß sie Artefakte sind, vorgetäuscht durch die Lactatdehydrogenase-Isoenzyme und die dissoziierte GDH. Alle anderen elektrophoretischen Untersuchungen wurden an Wirbeltieren (CORMAN et al. 1967) im Stärkegel durchgeführt und gaben nur eine Bande.

Abb.7 : Elektrophoretische Auftrennung der löslichen Proteine der Kieme; 50 µg Protein; a) Proteinfärbung mit Amidoschwarz, b) GDH-spezifische Färbung.

Beim Krebs ist das Intensitätsverhältnis der beiden Banden zueinander nicht reproduzierbar. Mitochondrienextrakte ergeben mit GDH-spezifischer wie mit proteinspezifischer Anfärbung eine geringere Anfärbung der unteren Bande als Totalextrakte. Nach Ammonsulfatfällungen ist die untere Bande weder im Präcipitat noch im Überstand wiederzufinden; sie läßt sich auch nicht durch Zusammengeben der beiden Fraktionen wieder hervorrufen. Es ist zu vermuten, daß die untere GDH-Bande durch die Verbindung

des Enzyms mit einem makromolekularen Bestandteil zustande kommt. Ob dieser Komplex aus der Bindung der GDH an das Mitochondrium entsteht oder aber artifiziell ist, läßt sich nicht entscheiden. Die Messungen am elektrophoretisch gereinigten Enzym beziehen sich immer auf die obere Bande.

5. Die Molekulargewichtsbestimmung wurde auf der analytischen Sepharose-4B-Säule durchgeführt. Zur Berechnung standen die Befunde von LOCASCIO et al. (1969) an diesem Gel zur Verfügung. Die Autoren geben ihre Ergebnisse in einer Größe an, die von der Geometrie und Packungsdichte der Säule unabhängig ist. Diese Größe ist von LAURENT und KILLIANDER (1964) folgendermaßen definiert worden:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

K_{av}: Das Säulenvolumen, das der untersuchten Substanz zugänglich ist
V_o : Freies Säulenvolumen (Bluedextran-Raum)
V_t : Gesamtes Säulenvolumen
V_e : Elutionsvolumen der untersuchten Substanz

Zusätzlich zum Elutionsvolumen der zu untersuchenden Substanz ist hierbei nur das freie Säulenvolumen mit einer Bluedextranlösung zu bestimmen, wenn man die von LOCASCIO et al. gegebene Umrechnungskurve von K_{av} in Molekulargewicht benutzt. Für die GDH des Krebses ergibt sich dabei je nach den Elutionsbedingungen ein anderes Molekulargewicht, wie man den Aktivitätsverteilungen aus Abb.8 entnehmen kann.
Das höchste Molekulargewicht erhält man in Tris 50 mM pH 7,5 mit 510 000. Der bei Zugabe von 1,35 mM ATP entstehende Peak bei einem Molekulargewicht von 260 000 könnte als Dissoziation des Moleküls in zwei Untereinheiten interpretiert werden. Der dritte Gipfel bei K_{av}= 0,81, der besonders deutlich mit einem Zusatz von 0,025% Natriumazid zum Elutionspuffer auftritt, wäre dann mit einem Molekular-

gewicht von 50 000 einer Dissoziation in ungefähr 10 Untereinheiten zuzuschreiben. Dieser Peak fällt aber nur langsam ab und endet erst kurz hinter einem Elutionsvolumen, das dem gesamten Säulenvolumen V_t entspricht.

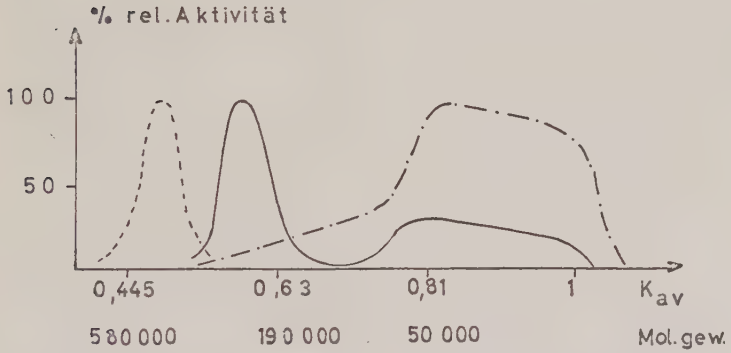

Abb.8 : Elution der GDH von einer Sepharose-4B-Säule mit verschiedenen Pufferzugaben. ---- Elution mit Tris/HCl 50 mM pH 7,5; —— Elution mit dem gleichen Puffer unter Zugabe von 1,35 mM ATP; -·-·- Elution mit dem gleichen Puffer unter Zugabe von 0,025% Natriumazid.

Benutzt man nur 0,002% Natriumazid im Elutionspuffer, so ergibt sich ein Aktivitätspeak, entsprechend einem Molekulargewicht von 280 000. Da der Fehler bei diesen Bestimmungen sicher 10% beträgt, ist dieser Peak dem mit Zugabe von ATP gefundenen gleichzusetzen.

Zur Deutung des letzten Elutionspeaks bei K_{av}= 0,81 ist mit ziemlicher Sicherheit auf Grund seiner Form und Lage anzunehmen, daß er nicht allein durch die Verteilungschromatographie, sondern auch durch Adsorptionen im Gel zustande kommt, da er sonst bei einem Volumen kleiner als V_t

abbrechen müßte. Der erste und zweite Gipfel sind wahrscheinlich echte Molekulargewichtsbestimmungen, da Zugabe von 200 mM Kaliumchlorid zu einem Elutionsmedium mit 0,002% Natriumazid das Elutionsvolumen nicht beeinflußt.

OLSON und ANFINSEN (1952) erhalten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration verschiedene Molekulargewichte für die Rinderleber-GDH. Diese Dissoziation von einem maximalen Molekulargewicht von 2 000 000 in sechs (EISENBERG und TOMKINS 1968) bis acht (SUND und BURCHARD 1968) Untereinheiten kann auch durch die GDH-Aktivität hemmende Substanzen wie NADH und ATP (FRIEDEN 1959a), Steroidhormone (YIELDING und TOMKINS 1960,1961), GTP und GDP (FRIEDEN 1962a,1963) und andere weniger physiologische Substanzen hervorgerufen werden. ADP hingegen fördert die Assoziation unter Aktivitätssteigerung. Ähnliche Befunde über die Beeinflussung der Kinetik und des Molekulargewichts gibt es für die GDH aus Menschenleber (LEHMANN und PFLEIDERER 1969), Froschleber (FAHIEN et al. 1965 a und b) und Hühnerleber (FRIEDEN 1962b; ANDERSON und JOHNSON 1969). Für die kinetischen Effekte ist jedoch die Veränderung des Molekulargewichts nicht unbedingt notwendig, da bei kleinen Enzymkonzentrationen, bei denen die Aktivität gemessen wird, sehr geringe oder keine Aggregation der Rinderleber-GDH auftritt, die kinetischen Effekte aber voll erhalten sind (FRIEDEN 1963). FISHER (1962) gelang es zu zeigen, daß tatsächlich die dissoziierte und assoziierte Form des Enzyms gleich aktiv sein können. Außerdem hat man trotz aller Suche beim Hai (CORMAN et al. 1967) und bei der Ratte (SEDGWICK und FRIEDEN 1968) bisher keine solchen Molekulargewichtsänderungen finden können, obwohl beide Enzyme in den allosterischen Eigenschaften der Rinderleber-GDH vergleichbar sind. Auch aus der Untersuchung FRIEDENs (1965) über das kinetische Verhalten der GDH aus verschiedenen Wirbeltieren, die einige vergleichbare Züge besitzen, ist nicht auf Änderungen im Molekulargewicht der Enzyme zu schließen.

Mit Dissoziationsfähigkeit und Molekulargröße ist die Krebs-GDH den GDH vieler Wirbeltiere vergleichbar (Tab.7).

Herkunft	kleinste aktive Einheit x 10^{-5}	größte aktive Einheit x 10^{-5}
Krebskieme	2,7	5,1
Hühnerleber	3,26 (1)	5,1 (2)
Rattenleber (3)	3,5	
Haileber (4)	3,3	
Froschleber (5,6)	2,5	5
Kaulquappenleber (6)	3,3	
Rinderleber	2,8 (7)	10 (8,9,10)
	2,8 (11)	22 (11)
	3,1 (12,13)	unbegrenzt (12,13)
Schweineleber	3,1 (13)	unbegrenzt (13)

Tabelle 7 : Vergleich der Molekulargewichte der kleinsten und der größten aktiven Einheiten verschiedener GDH.
(1) ANDERSON und SANG (1969); (2) FRIEDEN (1962b); (3) SEDGWICK und FRIEDEN (1968); (4) CORMAN et al. (1967); (5) FAHIEN et al.(1965a); (6) WIGGERT und COHEN (1966); (7) FRIEDEN (1968); (8) OLSON und ANFINSEN (1952); (9) KUBO et al.(1957); (10) SATO (1958); (11) SUND und BURCHARD (1968); (12) EISENBERG und TOMKINS (1968); (13) DESSEN und PANTALONI (1969).

6. Kinetik[1]. Die im 1/v gegen 1/(Substrat)-Diagramm nach LINEWEAVER und BURK (1934) dargestellte Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion von verschiedenen

1) In diesem Kapitel benutzte Abkürzungen:
I = Schnittpunkte der Geraden der Tertiärplots mit der Ordinate
I_p = Schnittpunkt der Geraden des Primärplots mit der Ordinate
I_s = Schnittpunkt der Geraden des Sekundärplots mit der Ordinate im I_p-gegen-1/(B)-Diagramm

Substratkonzentrationen (Abb.9 a-d) liefert für die Glutamatsynthese mit NADH als Coenzym Geraden, die formal einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik folgen. Allerdings ist der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse bei solchen Mehrsubstratreaktionen von den Konzentrationen der konstant gehaltenen Substrate abhängig, so daß er nicht direkt den Reziprokwert der entsprechenden Michaeliskonstanten wiedergibt. Diese kann man mit der im folgenden beschriebenen Methode nach DALZIEL (1969) aus den LINEWEAVER-BURK-Plots ermitteln, wenn man alle Substratkombinationen bei jeweils verschiedenen Konzentrationen gemessen hat.

Drei-Substratreaktionen haben folgende allgemeine Form (FRIEDEN 1959b):

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_A}{(A)} + \frac{K_B}{(B)} + \frac{K_C}{(C)} + \frac{K_{AB}}{(A)(B)} + \frac{K_{BC}}{(B)(C)} + \frac{K_{AC}}{(A)(C)} + \frac{K_{ABC}}{(A)(B)(C)}} \qquad (1)$$

Diese Gleichung kann bei einer Darstellung von 1/v gegen

(Fortsetzung der Fußnote 1))

I_s = Schnittpunkt der Geraden des Sekundärplots mit der Ordinate im I_p-gegen-1/(B)-Diagramm

I_s^s = Schnittpunkt der Geraden des Sekundärplots mit der Ordinate im S_p-gegen-1/(B)-Diagramm

S = Steigungen der Geraden der Tertiärplots

S_p = Steigung der Geraden des Primärplots

S_s = Steigung der Geraden des Sekundärplots im S_p-gegen-1/(B)-Diagramm

S_s^i = Steigung der Geraden des Sekundärplots im I_p-gegen-1/(B)-Diagramm

(A) = Konzentration von α-Ketoglutarat ($K_A = K_{\alpha\text{-K}}$)

(B) = Konzentration von NADH ($K_B = K_{NADH}$)

(C) = Konzentration von NH_4^+ ($K_C = K_{NH_4^+}$)

dazugehörige Michaeliskonstanten

K_i = Hemmkonstante

v = Anfangsgeschwindigkeit

V = Maximalgeschwindigkeit der Glutamatsynthese

T = 10^{-2}min x mg Protein/µMol NADH (Dimension der reziproken Geschwindigkeit)

1/(A) umgeformt werden in:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{(A)} \cdot \frac{1}{V} \left(K_A + \frac{K_{AB}}{(B)} + \frac{K_{AC}}{(C)} + \frac{K_{ABC}}{(B)(C)}\right) + \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_B}{(B)} + \frac{K_C}{(C)} + \frac{K_{BC}}{(B)(C)}\right) \qquad (2)$$

Hierbei gibt der Faktor von 1/(A) die Steigung, der zweite Summand den Schnittpunkt mit der 1/v-Achse an. Trägt man die Steigungen der Geraden dieses Primärplots gegen 1/(B) auf, so erhält man:

$$S_p = \frac{1}{(B)} \cdot \frac{1}{V} \left(K_{AB} + \frac{K_{ABC}}{(C)}\right) + \frac{1}{V} \left(K_A + \frac{K_{AC}}{(C)}\right) \qquad (3)$$

In dieser Gleichung für den Sekundärplot gibt der Faktor von 1/(B) die Steigung, der zweite Summand den Schnittpunkt mit der S_p-Achse an. Erstellt man für diesen Sekundärplot den Tertiärplot für die Steigung der Geraden im Sekundärplot S_s gegen 1/(C), so ergibt sich für die entstehende Gerade folgende Funktion:

$$S_s = \frac{1}{(C)} \cdot \frac{1}{V} K_{ABC} + \frac{1}{V} K_{AB} \qquad (4)$$

Hierin sind Steigung und Schnittpunkt mit der S_s-Achse nur jeweils durch zwei Konstanten gegeben. Verfährt man in der angegebenen Weise nicht nur mit der Steigung des Primärplots und Sekundärplots, sondern auch mit den Schnittpunkten des Primärplots und Sekundärplots mit der jeweiligen y-Achse (1/v- bzw. S_p- oder I_p-Achse), so erhält man insgesamt vier Tertiärplots:

$$I_s = \frac{1}{(C)} \cdot \frac{1}{V} K_C + \frac{1}{V} \qquad (5)$$

$$S_s = \frac{1}{(C)} \cdot \frac{1}{V} K_{ABC} + \frac{1}{V} K_{AB} \qquad (4)$$

$$I_s^s = \frac{1}{(C)} \cdot \frac{1}{V} K_{AC} + \frac{1}{V} K_A \qquad (6)$$

$$S_s^i = \frac{1}{(C)} \cdot \frac{1}{V} K_{BC} + \frac{1}{V} K_B \qquad (7)$$

Da in Gleichung (5) 1/V als Schnittpunkt der Geraden mit der

I_s-Achse zu entnehmen ist, lassen sich die anderen in den Gleichungen (4) bis (7) mit 1/V verbundenen Konstanten errechnen.

Diese Methode der Bestimmung der Konstanten ist nicht auf die hier willkürlich benutzte Reihenfolge der Darstellungen 1/(A), 1/(B), 1/(C) beschränkt. Jede andere Reihenfolge ist gestattet. Auf diese Weise kann man die erhaltenen Konstanten auf ihre Genauigkeit prüfen.

Auf die beschriebene Weise sind die in Tab. 8 wiedergegebenen Werte aus den Tertiärplots (Abb.11 a-d) über den Primärplot gegen 1/(A) (Abb.9 a-d) und die Sekundärplots gegen 1/(C) (Abb.10 a-b) erhalten worden. Diese Werte sind

V	5×10^{2} µMol NADH/min·mg Protein
$K_{\alpha\text{-}K}$	$7{,}5 \times 10^{-2}$ M
K_{NADH}	$2{,}5 \times 10^{-4}$ M
$K_{NH_4^+}$	1,5 M
$K_{\alpha\text{-}K,NADH}$	$2{,}5 \times 10^{-5}$ M^2
$K_{\alpha\text{-}K,NH_4^+}$	$2{,}7 \times 10^{-2}$ M^2
K_{NADH,NH_4^+}	$4{,}5 \times 10^{-4}$ M^2
$K_{\alpha\text{-}K,NADH,NH_4^+}$	$1{,}5 \times 10^{-5}$ M^3

Tabelle 8 : Aufstellung der aus Abb.3 a-d bestimmten Michaeliskonstanten.

kontrolliert mit solchen, bei denen die Primärplots gegen 1/(C), die Sekundärplots gegen 1/(A) und die Tertiärplots gegen 1/(B) aufgetragen worden sind. Diese Vergleichswerte sind nur verschieden für K_{AC} mit 25%, K_{BC} mit 80% und K_{ABC} mit 60%. Eine weitere Prüfung der angegebenen Michaeliskonstanten kann unter der Annahme geschehen, daß die gemischten Konstanten gleich dem Produkt der Einzelkonstanten ist, z.B. $K_{AB} = K_A \times K_B$. Für K_{AB} und K_{BC} liegt der Fehler zwischen berechnetem und bestimmtem Wert bei 30%, für K_{ABC}

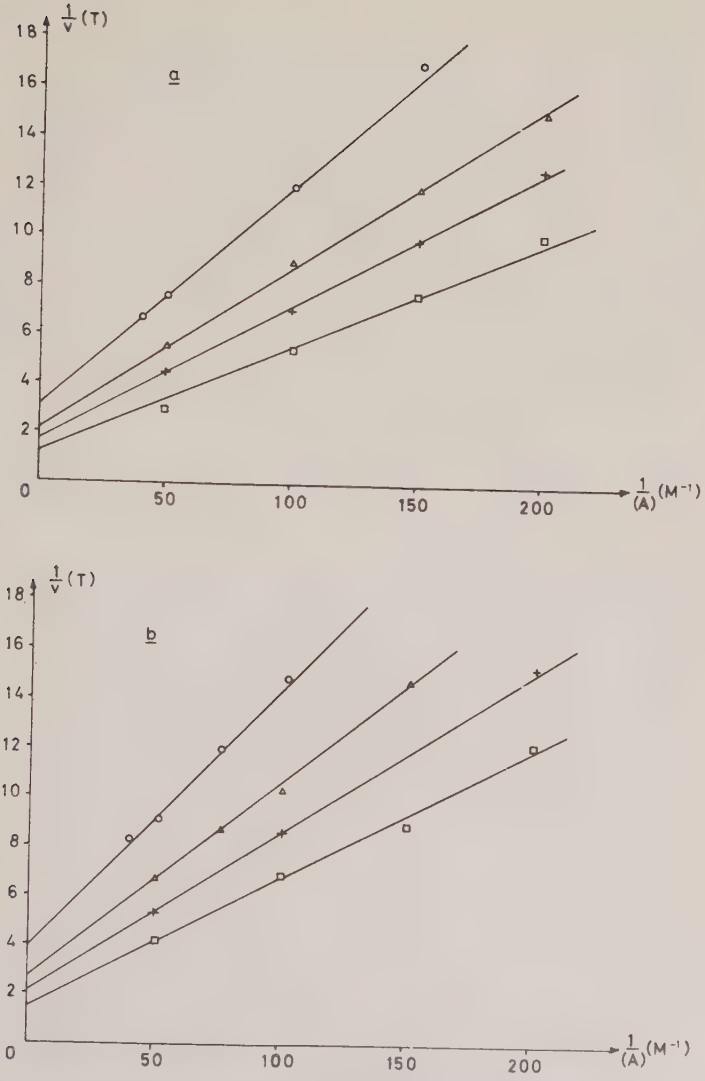

Abb.9a,b: Primärplot 1/v gegen 1/(α-Ketoglutarat) [≙ 1/(A)] bei einer NADH-Konzentration von a) 1 mM und b) 0,5 mM. Ammoniumionenkonzentration □ 200 mM, + 133 mM, △ 100 mM und ○ 66 mM.

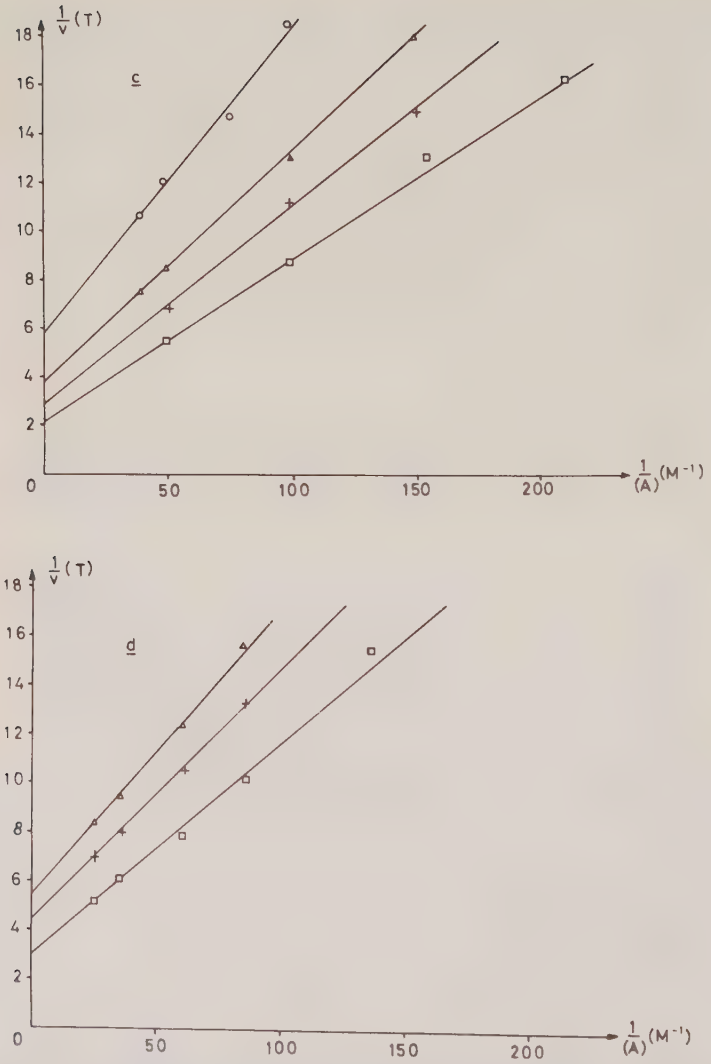

Abb.9c,d: Primärplot 1/v gegen 1/(α-Ketoglutarat)[≙ 1/(A)] bei einer NADH-Konzentration von c) 0,25 mM und d) 0,14 mM. Ammoniumionenkonzentrationen wie in Abb.9a,b.

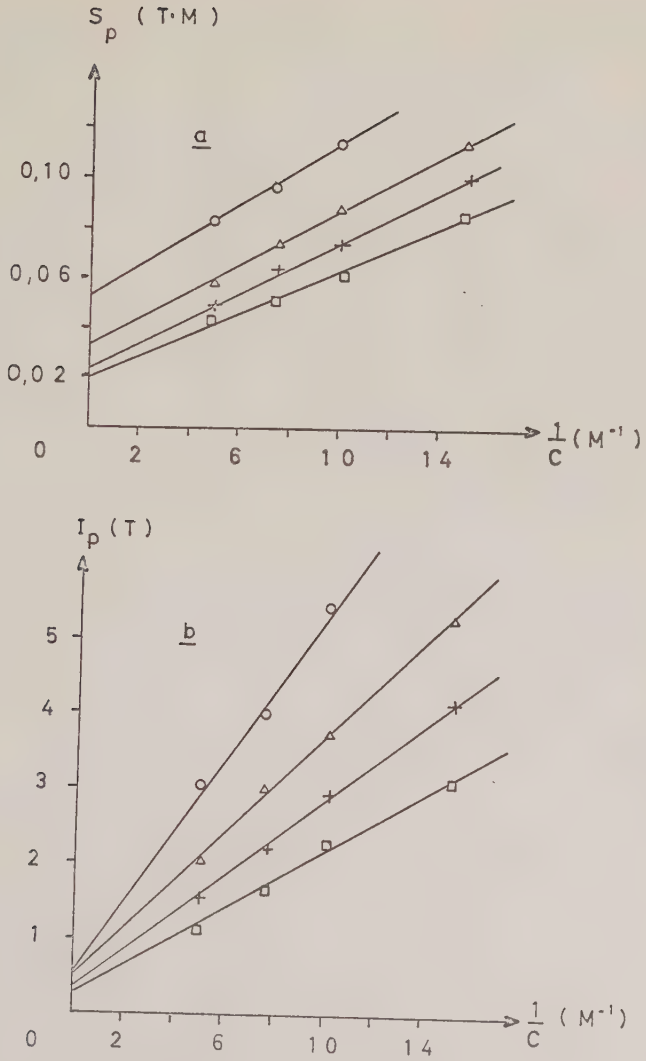

Abb. 10 : Sekundärplots a) der Steigungen und b) der Schnittpunkte mit der Ordinate gegen $1/(NH_4^+)$ [≙ 1/(C)] für □ 1 mM NADH, + 0,5 mM NADH, △ 0,25 mM NADH und ○ 0,14 mM NADH

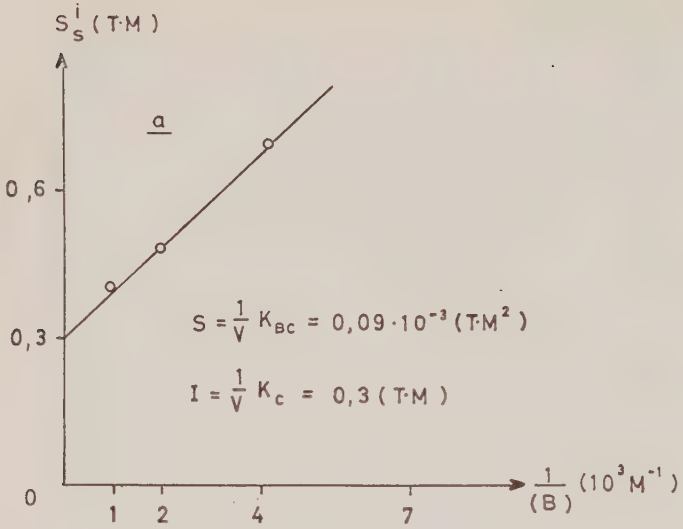

Abb. 11a : Tertiärplot der Steigung von Abb. 10b gegen 1/(NADH) [≙ 1/(B)]

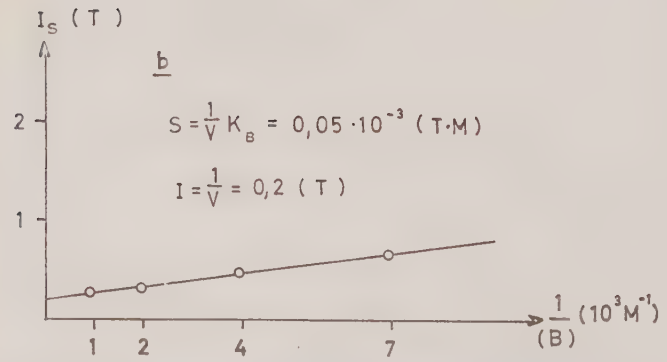

Abb. 11b : Tertiärplot der Schnittpunkte der Geraden mit der Ordinate von Abb. 10b gegen 1/(NADH) [≙ 1/(B)]

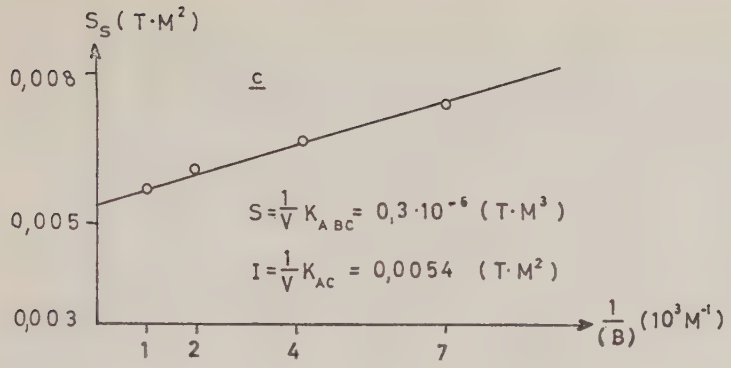

Abb. 11c : Tertiärplot der Steigung von Abb. 10a gegen 1/(NADH) [≙ 1/(B)]

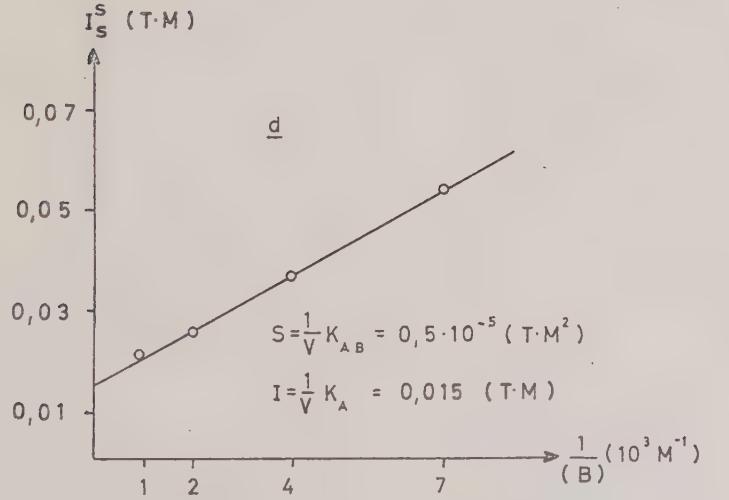

Abb. 11d : Tertiärplot der Schnittpunkte der Geraden mit der Ordinate von Abb. 10a gegen 1/(NADH) [≙ 1/(B)]

bei 80%. Für K_{AC} aber ist der berechnete Wert fünfmal größer als der gefundene. Diese Differenz läßt sich nur so deuten, daß tatsächlich keine gemeinsame Michaeliskonstante für α-Ketoglutarat und Ammoniumion existiert. Das heißt für die Reihenfolge der Substratanlagerung, daß α-Ketoglutarat und Ammoniumion nicht nacheinander angelagert werden. Zufällig kann die Reihenfolge nicht sein, da sonst keine scheinbare MICHAELIS-MENTEN-Kinetik zustande kommen könnte (DALZIEL 1969). Befunde über die Substratbindungsfolge bei GDH anderer Tiere liegen von FRIEDEN (1959b) für die Rinderleber-GDH, von FAHIEN et al. (1965a) für die Froschleber-GDH und von CORMAN et al. (1967) für die Haileber-GDH vor. Sie finden die Bindungsfolge Coenzym,Ammoniumion,α-Ketoglutarat. Hier existiert eine gemeinsame Michaeliskonstante für Ammoniumion und α-Ketoglutarat, nicht aber für NADH und α-Ketoglutarat.

Ein Vergleich der Michaeliskonstanten mit den Werten für andere Tiere zeigt Tab. 9. Hierbei ist auffällig, daß die Konstanten der Krebs-GDH für alle Substrate um ein bis zwei Zehnerpotenzen größer sind als bei den anderen Tieren. Dabei ergibt sich für die Michaeliskonstante des Ammoniumions ein physiologisch völlig unzulässiger Wert, da selbst 1/100 dieser Konzentration als letal anzusehen ist. Möglicherweise ist diese Konstante abhängig von der Art des Coenzyms und dem pH, wie BOND und SANG (1968) bei Drosophila gefunden haben. Bei dieser ist die Michaeliskonstante für das Ammoniumion mit NADPH um den Faktor 20 kleiner als mit NADH. Aber selbst die Verringerung der Michaeliskonstanten des Krebses für Ammoniumionen auf 75 mM beseitigt nicht die Notwendigkeit unphysiologisch hoher Ammoniumionenkonzentrationen für eine befriedigende Glutamatsynthese.

Diese Untersuchung für die Glutamatsynthese kann auf Grund der Komplexität einer Dreisubstratreaktion nur als eine Möglichkeit zur Annäherung an das tatsächliche Enzymgeschehen gesehen werden, das erst richtig deutbar wird durch die Zuhilfenahme anderer direkter Ergebnisse über die Enzymwirkung, wie sie FRIEDEN (1959b) für die Rinder-

Michaeliskonstante für	Drosophila[1]	Hai[2]	Ratte[3] Kern	Ratte[3] Mitochondrien	Frosch[4]	Kaulquappe[5]	Rind[6]	Mensch[8]	Krebs
Glutamat	$1{,}7\times10^{-3}$	$2{,}5\times10^{-3}$	9×10^{-4}	$4{,}3\times10^{-3}$	$1{,}8\times10^{-3}$		$1{,}8\times10^{-3}$	$1{,}6\times10^{-3}$	$0{,}11^{+++)}$
α-Ketoglutarat	$3{,}3\times10^{-3}$	$5{,}0\times10^{-4}{}^{+)}$ $4{,}5\times10^{-3}{}^{++)}$	$1{,}3\times10^{-4}$	$4{,}5\times10^{-4}$	5×10^{-3}		7×10^{-4}	$1{,}9\times10^{-3}$	$7{,}5\times10^{-2}$
Ammoniumion	$0{,}3\text{-}0{,}6^{+)}$ $0{,}02^{++)}$	$1{,}4\times10^{-2}{}^{+)}$ $8\times10^{-2}{}^{++)}$	$1{,}1\times10^{-2}$	3×10^{-2}	5×10^{-4}		$3{,}2\times10^{-3}$	2×10^{-2}	1,5.
NADH	10^{-5}	2×10^{-5}	$2{,}3\times10^{-5}$	$2{,}3\times10^{-5}$	3×10^{-5}	$3{,}7\times10^{-5}$	$9{,}5\times10^{-5}$[7]	$1{,}1\times10^{-4}$	$2{,}5\times10^{-4}$
NAD^+		$2{,}4\times10^{-3}$	$5{,}8\times10^{-5}$	$2{,}2\times10^{-5}$	2×10^{-5}	2×10^{-4}	1×10^{-4}[7]	$1{,}7\times10^{-4}$	$1{,}1\times10^{-2}{}^{+++)}$
NADPH		4×10^{-4}			2×10^{-4}	$1{,}2\times10^{-4}$	$2{,}6\times10^{-5}$	$3{,}9\times10^{-5}$	
$NADP^+$		8×10^{-5}			5×10^{-4}	$1{,}6\times10^{-2}$	$4{,}7\times10^{-5}$	$1{,}2\times10^{-3}$	

Tabelle 9 : Vergleich der Michaeliskonstanten verschiedener GDH (Dimension: M).

1) BOND und SANG (1968) Messungen mit ADP 2) CORMAN et al.(1967 a u. b) 3) DI PRISCO et al. (1968) 4) FAHIEN et al.(1965 a u. b) 5) WIGGERT und COHEN (1966) 6) FRIEDEN (1959 b) 7) OLSON und ANFINSEN (1953) 8) LEHMANN und PFLEIDERER (1968)

+) mit NADH

++) mit NADPH

+++) bestimmt als Hemmkonstanten

leber-GDH gesammelt hat. Zweifelhaft in ihrem Wert wird diese Interpretation der kinetischen Daten für die Krebs-GDH dadurch, daß das elektrophoretisch gereinigte Enzym zwar

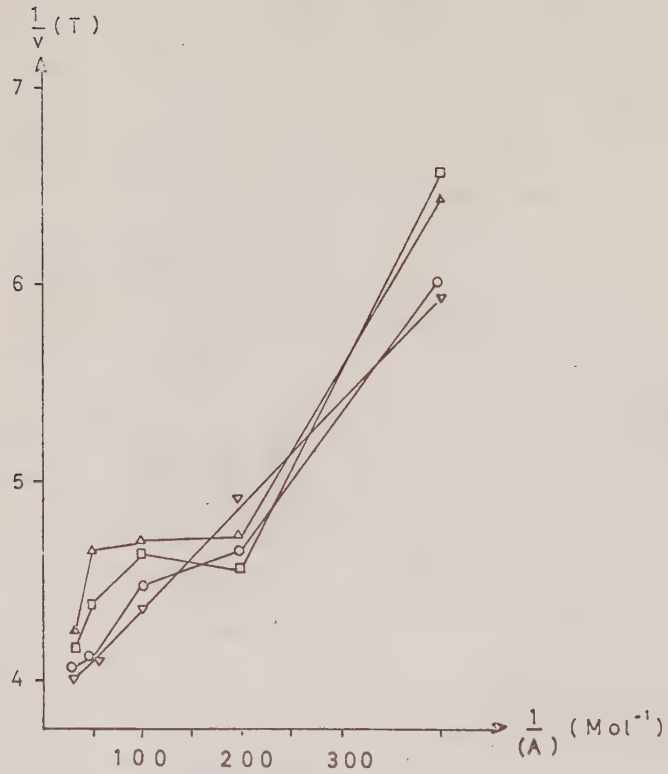

Abb.12 : LINEWEAVER-BURK-Plot für nicht elektrophoretisch gereinigtes Enzym mit variabler α-Ketoglutaratkonzentration bei konstanter Ammoniumionenkonzentration (200 mM) und folgenden NADH-Konzentrationen: □ 0,12 mM, △ 0,18 mM, ○ 0,24 mM und ▽ 0,36 mM. Weitere Bedingungen wie beim Standardtest.

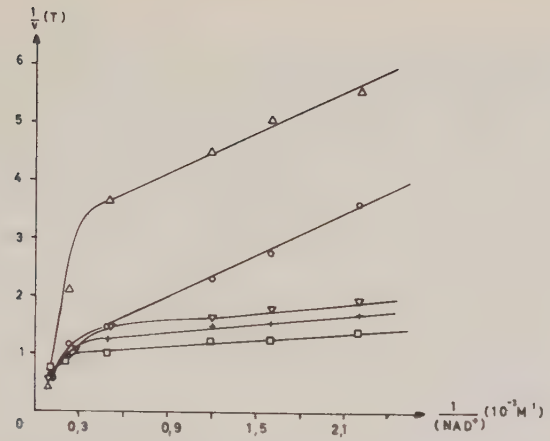

Abb.13: 1/v-gegen-1/(NAD^+)-Diagramm mit folgenden Glutamatkonzentrationen: △ 56 mM, □ 75 mM, + 94 mM, ▽ 131 mM und ○ 187 mM. Weitere Testbedingungen siehe Standardtest für Glutamatabbau.

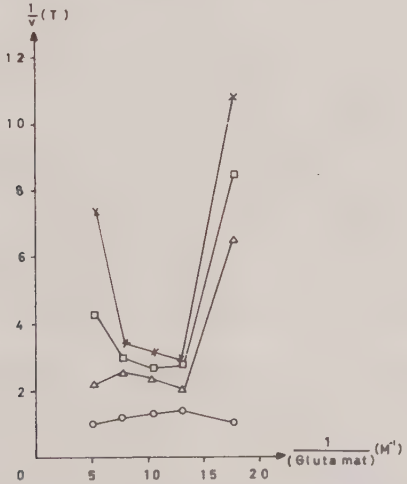

Abb.14: Umzeichnung der Abb.13 in 1/v gegen 1/(Glutamat) mit folgenden NAD^+-Konzentrationen: ○ 3,4 mM, △ 1,7 mM, □ 1,2 mM und + 0,35 mM.

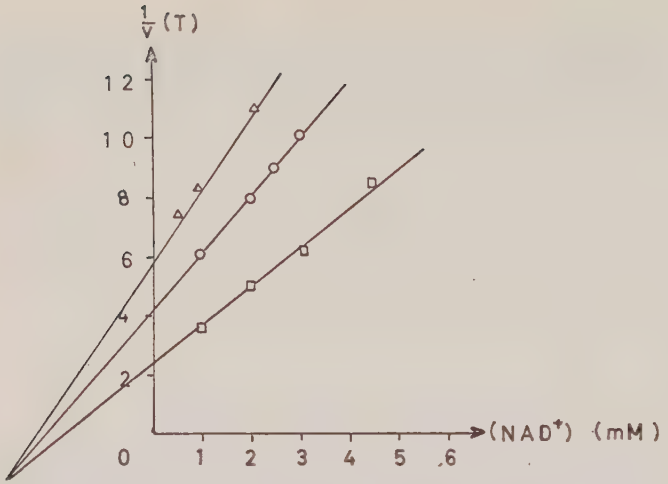

Abb. 15 : Hemmung der Glutamatsynthese durch NAD^+.
□ Standardtest, Standardtest mit ○ 15 mM α-Ketoglutarat und mit △ 10 mM α-Ketoglutarat

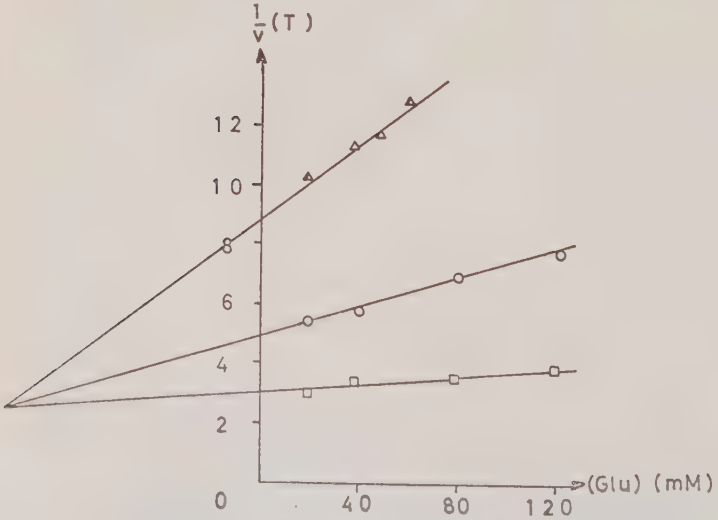

Abb. 16 : Hemmung der Glutamatsynthese durch Glutamat (Glu).
□ Standardtest, Standardtest mit ○ 0,18 mM NADH und mit △ 0,09 mM NADH

hinlänglich genug einer scheinbaren MICHAELIS-MENTEN-Kinetik folgt, um mit der beschriebenen Methode die Michaeliskonstanten zu bestimmen; das gilt aber keineswegs für die Ergebnisse mit dem nicht elektrophoretisch gereinigten Enzym, wie Abb.12 zeigt. Die geschilderten Ergebnisse sind daher in Bezug auf das tatsächliche Geschehen im Krebs mit Vorbehalt zu betrachten. Außerdem ist beim Vergleich der Ergebnisse mit denen der in Tab. 9 zitierten Autoren zu bedenken, daß diese mit NADPH als Coenzym gearbeitet haben, da sie mit NADH allosterische Effekte erhalten.

Für den Glutamatabbau durch das elektrophoretisch gereinigte Enzym gilt keine formale MICHAELIS-MENTEN-Kinetik (Abb.13, 14). Während sich im LINEWEAVER-BURK-Plot 1/v gegen $1/(NAD^+)$ bei veränderlicher Glutamatkonzentration lineare Funktionen ergeben, die aber keinen gemeinsamen Schnittpunkt haben (Abb.13), ist im Plot 1/v gegen 1/(Glutamat) auch das nicht mehr gegeben. Hier zeigt die graphische Darstellung einen ausgeprägten Bereich maximaler Aktivität, wobei die Gipfelbildung von der Coenzymkonzentration abhängig ist (Abb.14).

Ein Versuch, aus Substrathemmungen (Abb.15, 16) einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise von NAD^+ und Glutamat zu gewinnen, hat zu keinem Ergebnis geführt, da die Hemmung rein kompetitiv ist (DIXON 1953). Als Hemmkonstanten ergeben sich $K_{iNAD^+} = 1{,}1 \times 10^{-2}$ M und $K_{iGlutamat} =$ 0,11 M. Über die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Glutamat- und der Coenzymkonzentration läßt sich daher nur sagen, daß diese beiden Substanzen am Enzym aufeinander einwirken unter gegenseitiger Veränderung der kinetischen Daten.

7. Substratspezifität. a) Spezifität für Aminosäuren. Bei den Wirbeltieren ist die GDH zum Teil sehr wenig spezifisch. So kann das Enzym vom Frosch und von der Kaulquappe mit beachtlicher Geschwindigkeit außer Glutamat auch andere Aminosäuren umsetzen (Tab. 10). Bemerkenswert ist bei diesen beiden ontogenetisch verbundenen Formen die Veränderung der Spezifität während der Entwicklung. Weit spezifischer ist die GDH

von der Rinderleber (Tab. 10). Bei ihr ist die Alanindehydrogenaseaktivität durch allosterische Effektoren steuerbar (TOMKINS et al. 1961; TOMKINS und YIELDING 1961; TOMKINS et al. 1963; YIELDING et al. 1964). Für die Hühner-

L-Aminosäure	Relative Aktivität			
	Krebs[1]	Frosch[2]	Kaulquappe[2]	Rind[3]
Glutaminsäure	100	100	100	100
Glutamin	0	36	13	--
Asparaginsäure	0	7	18	< 0,1
Asparagin	0	--	--	--
Alanin	0	4	11	0,27
Glycin	0	--	--	--
Valin	0[4]	18	18	1,7
Norvalin	11[4]	10	12	17
Leucin	0	14	19	1,7
Norleucin	--	2	36	1,6[4]
Isoleucin	0	18	16	0,95
Lysin	0	7	11	< 0,1
α-Amino-n-butyrat	--	30	10	2,3
Ornithin	--	25	21	< 0,1

Tabelle 10 : Oxidation einiger Aminosäuren durch verschiedene GDH.

1) Testbedingungen: Standardtest für Glutamatabbau unter Veränderung folgender Konzentrationen: NAD^+ 2,7 mM, Aminosäure 50 mM für L-Formen, 90 mM für D,L-Formen. 2) Nach WIGGERT und COHEN (1966) für pH 8. 3) Nach STRUCK und SIZER (1960).
4) D,L-Form

leber-GDH ist durch STRUCK und SIZER (1960) bekannt, daß sie auch Leucindehydrogenaseaktivität besitzt. Wie aus Tab. 10

zu entnehmen ist, scheint das Enzym aus den Kiemen des Krebses sehr spezifisch zu sein. Einzig mit Norvalin ist eine zusätzliche Aktivität zu finden. Für die anderen mit Null angegebenen Aminosäuren ist festzustellen, daß ihre Aktivität unter 1% der Aktivität mit Glutamat, der Erfassungsgrenze des benutzten Tests, liegen muß. Norvalin hat möglicherweise am Enzym seine eigene Reaktionsweise, da sein Umsatz im Gegensatz zu dem von Glutamat nicht durch ATP gehemmt werden kann. Außerdem kann Norvalin in einer Konzentration von 100 mM die aktivitätserhaltenden Eigenschaften des Rinderserumalbumins zumindest über einen kurzen Zeitraum (15 min) voll ersetzen und läßt das Enzym auch ohne Proteinzusatz voll Aktivität mit Glutamat zeigen.

In Anschluß an den jeweiligen Versuch, eine Aminosäure mit der Krebs-GDH zu oxidieren, wurden 90 mM Glutamat zugegeben, um den Einfluß der Aminosäuren auf die Glutamatoxidation zu testen. In der Tab. 11 sind die Ergebnisse zusammengefaßt und mit denen von WIGGERT und COHEN (1965) für die Froschleber-GDH und den qualitativen Befunden von YIELDING und TOMKINS (1961) zusammengefaßt. Es fällt auf, daß die Krebs-GDH mit keiner Aminosäure aktiviert wird, sondern immer Hemmung auftritt. Eine Ausnahme macht das Norvalin, das die Aktivität nicht beeinflußt.

Zugesetzte L-Aminosäure	Wirkung auf die Glutamatoxidation		
	Krebs[1]	Frosch[3]	Rind[4]
Ohne	100	100	100
Glutamin	50	124	--
Asparaginsäure	70	112	--
Asparagin	75	--	--
Alanin	65	41	hemmt
Glycin	60	--	--
Valin	75[2]	112	100
Norvalin	100[2]	122	aktiviert
Leucin	90	131	aktiviert
Isoleucin	90	98	aktiviert
Lysin	90	105	100
Ornithin	--	100	100
α-Amino-n-butyrat	--	100	100

Tabelle 11 : Relative Aktivitäten des Glutamatabbaus in der Gegenwart anderer L-Aminosäuren.

1) Testbedingungen wie in Tab. 10. Zusätzlich wurden 90 mM Glutamat gegeben, die auch der Kontrolltest enthält. 2) Es wird die D,L-Form dieser Aminosäure eingesetzt mit einer Konzentration von 90 mM, während sonst nur 50 mM benutzt werden. 3) Nach WIGGERT und COHEN (1965). 4) Qualitative Angaben nach YIELDING und TOMKINS (1961).

7 b) Coenzymspezifität. Das Verhältnis der GDH-Aktivitäten mit verschiedenen Coenzymen zeigt für die Glutamatbildung nur bei dem Thunfisch einen Wert, der in seiner Größe dem der Krebs-GDH nahe kommt. Für die Rückreaktion hingegen ist NAD^+ beim Krebs in unvergleichlicher Weise bevorzugt (Tab. 12).

Enzym	$\frac{NADH}{NADPH}$	$\frac{NAD^+}{NADP^+}$
Krebs[1)]	23	83
Drosophila[2)]	3-4	10
Hai	12,6	15
Thunfisch	18	
Heilbutt	2,6	
Alligator	0,9	
Huhn	1,7	2
Krähe	2	
Fasan	2,3	
Kaninchen	1,5	
Ratte[3)]		1,7
Rind	1,5	2
Mensch,Leber	2	
Mensch,Placenta[4)]		3

Tabelle 12 : Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten mit verschiedenen Coenzymen für die Hin- und Rückreaktion von GDH unterschiedlicher Herkunft. (Nach CORMAN et al. 1967)

1) Testbedingungen: Aktivität mit NADH: Standardtest; Aktivität mit NADPH: Standardtest, aber statt NADH 1 mM NADPH; Aktivität mit NAD^+: Standardtest mit 50 mM Glutamat und 2,7 mM NAD^+; Aktivität mit $NADP^+$: Wie Test mit NAD^+, statt NAD^+ 4,1 mM $NADP^+$. 2) BOND und SANG (1968); 3) KLINGENBERG und PETTE (1962); 4) GAULL et al.(1960)

Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß beim Flußkrebs die GDH in vivo NAD-spezifisch ist. Für definitive Aussagen sind aber noch weitere Untersuchungen nötig. Für die Ratte, bei der das Verhältnis der Aktivitäten mit NAD^+ und $NADP^+$ wie 100:60 ist (KLINGENBERG und PETTE 1962), sind derartige Messungen durchgeführt worden. Dabei hat sich aus Messungen des Reduktionszustandes der in Frage kommenden Coenzyme mit verschiedenen Substraten an isolierten Mitochondrien eine Bevorzugung von $NADP^+$ bzw. NADPH ergeben, deren Gesamt-Konzentration sich zu der von NAD^+ + NADH wie 2:1 verhält (KLINGENBERG und SLENCZKA 1959). Weitere Überlegungen über die Proportionskonstanz der Summe von Isocitrat- und Glutamatdehydrogenase mit der NADP-Konzentration (KLINGENBERG und PETTE 1962) stützen die Vermutung, daß in der Ratte in vivo NADP als Coenzym dient. TAGER und PAPA (1965) schließlich belegen diese Meinung durch direkte Messungen an Mitochondrien. Die im Vergleich mit der Ratte extrem hohen Werte der Aktivitätsquotienten $NAD^+/NADP^+$ bzw. NADH/NADPH beim Krebs lassen erwarten, daß ein sehr hoher Anteil des GDH-Umsatzes mit NAD^+ bzw. mit NADH als Coenzym verläuft. Dafür spricht auch die Unmöglichkeit, die Rückreaktion kompetitiv mit einem Überschuß an $NADP^+$ zu hemmen (Tab. 14). Unter den benutzten Testbedingungen ist NADH das favorisierte Coenzym, da mit ihm die Reaktion 21,5mal schneller verläuft als mit NAD^+.

8. Aktivierung und Hemmung. Bisher ist bei allen untersuchten tierischen GDH ein Einfluß von Purinnucleotiden auf die Enzymaktivität gefunden worden. Orientierende Untersuchungen am Krebs haben zu qualitativ vergleichbaren Resultaten (Tab. 13) geführt. Tabelle 14 zeigt, daß außer den Purinnucleotiden weitere Intermediärprodukte des Stoffwechsels das Enzym vom Krebs beeinflussen können, wobei die Wirkung auf eine Reaktionsrichtung beschränkt sein kann, wie beim Uridin-5'-diphospho-N-acetylglucosamin und 5-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat (5-HT). Bei den Diphosphaten des Adenosins und Guanosins und dem Fructose-6-phosphat ist der schon unter Optimalbedingungen beob-

Enzym	ADP	ATP	GDP	GTP
Rind[1)2)]	+	–	–	–
Mensch[3)]	+			–
Ratte[4)]	+	+	–	–
Hai[5)]	+			–
Huhn[6)]	+	–		
Frosch[7)]	+	0		
Kaulquappe[6)]	+	–		
Forelle[6)]	+	–		
Drosophila[8)]	+	0	–	–
Krebs	+	–	–	–

Tabelle 13 : Wirkung von Purindi- und -triphosphaten auf die GDH verschiedener Herkunft mit NADH als Coenzym.
+ = Aktivierung
– = Hemmung
0 = kein Effekt

1) Nach FRIEDEN (1959a). 2) Nach FRIEDEN (1962a). 3) Nach LEHMANN und PFLEIDERER (1968). 4) Nach SEDGWICK und FRIEDEN (1968). 5) Nach CORMAN und KAPLAN (1967). 6) Nach FRIEDEN (1965). 7) Nach FAHIEN et al.(1965b). 8) Nach BOND und SANG (1968).

Substanz	Konzentration (10^{-4}M)	Glutamatoxidation[1]	Glutamatsynthese Test a[2]	Test b[2]
Ohne		100	100	100
AMP	4,5	147	115	114
ADP	3,2	211	155	198
ATP	3,1	60	83	81
GMP	4,3	78	82	77
GDP	2,9	26	40	28
GTP	2,4	14	8	13
Uridin-5'-diphospho-N-acetylglucosamin	2,5	100	87	83
5-HT	4,9	96	75	81
Cycl. 3',5'AMP	1,37		100	100
$NADP^+$	2,2		100	100
Glucose-6-phosphat	5,9		100	100
Fructose-6-phosphat	6,0		82	70
D,L-Thyroxin	2,7		100	100
KCl	2000	160	100	

Tabelle 14 : Einflüsse verschiedener Substanzen auf die Aktivität der Krebs-GDH für die Hin- und Rückreaktion unter optimalen Bedingungen und auf die Rückreaktion außerhalb der Substratsättigung (Test b).

1) Abweichend von dem Standardtest für die Glutamatoxidation wurden folgende Konzentrationen verwendet: NAD^+ 2,7 mM; Glutamat 100 mM. 2) Test a entspricht dem Standardtest. Test b hatte folgende, veränderte Konzentrationen: NADH 0,08 mM; NH_4^+ 100 mM; α-Ketoglutarat 10 mM.

achtbare Aktivierungs- oder Hemmeffekt bei suboptimalen Substratkonzentrationen (Test b, Tab. 14) noch verstärkt. Besonders zu erwähnen sind noch die Wirkungen von AMP und GMP, die bisher nicht berücksichtigt worden sind. Beim Krebs erfolgt mit AMP eine deutliche Aktivierung besonders der Glutamatoxidation, während GMP beide Reaktionsrichtungen um 1/5 hemmt.

Thyroxinhemmungen, die für die Rinderleber-GDH ausführlich von WOLFF und WOLFF (1957) und WOLFF (1962 a u. b) auf ihre kinetischen und molekularen Wirkungen untersucht sind, lassen sich beim Krebs nicht finden.

Einsinnig aktivierend wirken 200 mM Natriumchlorid auf die Glutamatoxidation. Erhöhung der Natriumchloridkonzentration liefert keine weitere Aktivitätssteigerung. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden von SCHOFFENIELS (1966) und CHAPLIN et al. (1965), die für die Rinderleber-GDH und die GDH vom Hummer- und Taschenkrebsmuskel auf jeden Fall die stärkere Aktivierung für die Glutamatsynthese fanden.

SCHLUSSBETRACHTUNG

Vergleichende Studien durch kinetische Messungen (FRIEDEN 1965) und durch immunologische Untersuchungen (TALAL und TOMKINS 1964) über die allosterischen Eigenschaften von GDH verschiedener Herkunft lassen die Unterscheidung in "tierische" GDH, die durch Effektoren beeinflußt werden kann, und "nichttierische" gerechtfertigt erscheinen. Auf Grund der hier berichteten Ergebnisse über den Flußkrebs läßt sich seine GDH eindeutig als "tierische" einstufen.

Welche Bedeutung dieses Enzym im Krebs hat, läßt sich nur schwer vermuten, zumal es durch die Möglichkeit der Transaminierung einen Nebenweg des Umsatzes von Glutamat zu α-Ketoglutarat gibt. Diesem Weg wird bei Säugern der weitaus größte Anteil an dem Umsatz zugesprochen (BORST und SLATER 1960; BORST 1962; QUAGLIARIELLO et al. 1965; DE HAAN 1967), wie auch von BURSELL (1963,1966) für die Tsetse-Fliege. SACKTOR (1961) vermutet allerdings, daß die Aminosäuren, die im Insekt (im Muskel der Larven von Bombyx mori 80 µMol/g (BRETEUX-GRéGOURE et al. 1961)) eine weit höhere Konzentration haben als im Säuger (im Rattenmuskel 14 µMol/g (HERBERT et al. 1966)), für die Energieproduktion im Insektenmuskel herangezogen werden. Deshalb nimmt er an, daß hier die GDH eine wichtigere Rolle im Glutamatabbau spielt als im Säuger.

Im Krebs ist neben einer gegenüber Säugern hohen Aminosäurekonzentration (im Astacus-Muskel 144 µMol/g (DUCHÂTEAU-BOSSON und FLORKIN (1963)) noch eine andere Tatsache zu berücksichtigen: Hier erfolgt die Stickstoffexkretion in starkem Maße in Form von Ammoniumionen. Neben der Energiegewinnung könnte durch oxidative Desaminierung eine Exkretion der Ammoniumionen speziell in den Kiemen des Krebses erfolgen. Dafür spricht, daß in der Hämolymphe kein freies Ammoniak nachzuweisen ist (ANDREWS 1967). Das bedeutet aber auch, daß eines der Substrate, welches in hoher Konzentration benötigt wird ($K_{NH_4^+}$ = 1,5 M), praktisch

nicht verfügbar ist.

FRIEDEN (1963b) diskutiert für die Rinderleber-GDH die Möglichkeit der Regulation durch Purinnucleotide. Diese Überlegungen gelten sicherlich auch für den Flußkrebs, wenn auch wahrscheinlich nur in begrenztem Maße. Hervorzuheben ist, daß das Enzym vom Krebs wie vom Rind (FRIEDEN 1962a, 1959a) und von Drosophila (BOND und SANG 1968) sowohl mit den Adenosin- wie auch Guanosinmono- und -diphosphaten einen höheren Umsatz als mit den entsprechenden Triphosphaten zeigt. Als Steuermechanismus ist diese Wirkung nur sinnvoll hinsichtlich der Regulation der Energiegewinnung durch die GDH, das heißt, der oxidativen Desaminierung des Glutamats.

Unter Berücksichtigung der in der Einleitung erwähnten Befunde von SPECK und URICH (1969) ist anzunehmen, daß tatsächlich die GDH eine bedeutende Rolle im Abbau der Glutaminsäure spielt, wobei ihr wahrscheinlich auf Grund der mit $NADP^+$ sehr viel geringeren Aktivität (Tab. 12) eine hohe NAD^+-Spezifität zukommt. Die Aminierung zu Glutamat, die beim Umsatz von z.B. Palmitat und Glucose zu Glutamat nötig ist, könnte durch Transaminasen geschehen. Diese sind im Krebs mit erheblichen Aktivitäten nachgewiesen worden (URICH 1967).

In diese Überlegungen sind die in dieser Arbeit für die GDH des Krebses angegebenen Michaelis- und Hemmkonstanten (Tab. 9) nicht mit einbezogen worden, da sie in Abhängigkeit von Effektoren (FRIEDEN 1965) und Ionen (CORMAN und KAPLAN 1967) stark schwanken können. Außerdem sind bei diesen Folgerungen alle Probleme, die durch die Strukturgebundenheit der GDH und das besondere Milieu des mitochondrialen Zellkompartiments bedingt sind, nicht berücksichtigt.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Die Glutamatdehydrogenase aus der Kieme des Flußkrebses wurde einmal ohne und einmal mit Vorkehrungen zur Hemmung der Phenoloxidase gereinigt.

2) Untersuchungen an der Phenoloxidase lassen vermuten, daß sie auch auf aromatische Aminosäuren in peptidischer Bindung wirken kann.

3) Die GDH zeigt in der Elektrophorese mit Rohhomogenaten Zweibandigkeit, die nach Ammonsulfatfällung verschwindet.

4) Durch Gelfiltration ermittelte verschiedene Molekulargewichte in Abhängigkeit von Effektoren (ATP, Natriumazid) zeigen, daß die GDH mit einem Molekulargewicht um 500 000 in mindestens zwei Untereinheiten zerfallen kann.

5) Das Enzym zeigt hohe Substratspezifität für Glutamat. Eine geringere Aktivität mit Norvalin hat möglicherweise einen anderen Reaktionsmechanismus als die mit Glutaminsäure. Unter den benutzten Standardbedingungen ist der Glutamatabbau mit NAD^+ 21,5mal geringer als die Synthese mit NADH. Die Reaktion mit $NADP^+$ ist 120mal geringer als mit NADPH. NADH ist vor NADPH um den Faktor 23 bevorzugt, NAD^+ vor $NADP^+$ um den Faktor 83.

6) Kinetische Untersuchungen ergeben für die Glutamatsynthese mit NADH am elektrophoretisch gereinigten Enzym eine formale MICHAELIS-MENTEN-Kinetik. Graphisch sind folgende Konstanten ermittelt worden: $V = 5 \times 10^2$ µMol NADH/min·mg Protein, $K_{NH_4^+} = 1{,}5$ M, $K_{\alpha\text{-Ketoglutarat}} = 7{,}5 \times 10^{-2}$ M, $K_{NADH} = 2{,}5 \times 10^{-4}$ M. Der Glutamatabbau ist nicht durch das MICHAELIS-MENTEN-Modell zu erfassen. Hierfür bestimmte Hemmkonstanten sind $K_{iGlutamat} = 0{,}11$ M und $K_{iNAD^+} = 1{,}1 \times 10^{-2}$ M. Für das nicht elektrophoretisch gereinigte Enzym ergeben sich im LINEWEAVER-BURK-Plot keine Geraden für die Glutamatsynthese.

7) AMP und ADP wirken aktivierend, ATP und die Guanosinphos-

phate hemmend in beiden Reaktionsrichtungen. Uridin-5'-diphospho-N-acetylglucosamin und 5-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat hemmen nur die Glutamatsynthese. Auf die Synthese wirkt außerdem Fructose-6-phosphat hemmend, während cyclisches 3'5'AMP, Thyroxin, Glucose-6-phosphat und $NADP^+$ keine Wirkung darauf zeigen. Kaliumchlorid aktiviert nur die Glutamatoxidation.

LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM,K., K.SCHÜTT, I.MÜLLER und H.HOFFMEISTER (1970): Kontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese. I. Untersuchungen an Normalseren. Z. klin. Chem. klin. Biochem., 8,92-98

ALLMANN,R.W., E.BACHMANN, N.ORME-JOHNSON, W.C.TAN und D.E.GREEN (1968): Membrane systems of mitochondria. VI. Membranes of liver mitochondria. Arch. Biochim. Biophys., 125,981-1012

ANDERSON,P.J. und P.JOHNSON (1969): A comparative study of the glutamate dehydrogenases isolated from bovine and chicken livers. Biochim. biophys. Acta, 181,45-51

ANDREWS,P. (1967): Über den Blutchemismus des Flußkrebses Orconectes limosus und seine Veränderung im Laufe des Jahres. Z. vergl. Physiol., 57,7-43

BARRATT,R.W. und W.N.STRICKLAND (1963): Purification and characterisation of a TPN-specific glutamic acid dehydrogenase from Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys., 102,66-76

BERGMEYER,H.-U. (1962): Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim a.d. Bergstr., Verlag Chemie, 1065 S.

BOND,P.A. und J.H.SANG (1968): Glutamate dehydrogenase of Drosophila larvae. J. Insect Physiol., 14,341-359

BORST,P. und E.C.SLATER (1960): The oxidation of glutamate by rat heart sarcosomes. Biochim. biophys. Acta, 41, 170-171

BORST,P. (1962): The pathway of glutamate oxidation by mitochondria isolated from different issues. Biochim. biophys. Acta, 57,256-269

BRÛTEUX-GRéGOURE,A., G.DUCHâTEUX-BOSSON, C.JEUNIAUX, E.SCHOFFENIELS und M.FLORKIN (1963): Constitants osmotiquement actifs du sang et des muscles du scorpion Androctonus australis L.
Arch. int. Physiol. Biochim., 71,393-400

BULEN,W.A. (1956): The isolation and characterisation of glutamic dehydrogenase from corn leaves.
Arch. Biochim. Biophys., 62,173-183

BURSELL,E. (1963): Aspects of the metabolism of amino acids in the tsetse fly, Glossina(Diptera).
J. Insect Physiol., 9,439-452

BURSELL,E. (1966): Aspects of the flight metabolism of the tsetse flies (Glossina). Comp. biochem. Physiol., 19, 809-818

CHAPLIN,A.E., A.K.HUGGINS und K.A.MUNDAY (1965): Ionic effects on glutamate dehydrogenase activity from beef liver, lobster muscle, and crab muscle. Comp. biochem. Physiol., 16,49-62

CHAPLIN,A.E., A.K.HUGGINS und K.A.MUNDAY (1966): The role of amino acids during osmotic adjustment in aquatic invertebrates. Biochem. J., 99,42p

CORMAN,L., L.M.PRESCOTT und N.O.KAPLAN (1967): Purification and kinetic characteristics of dogfish liver glutamate dehydrogenase. J. biol. Chem., 242,1383-1390

CORMAN,L. und N.O.KAPLAN (1967): Kinetic studies of dogfish liver glutamate dehydrogenase with diphosphopyridine nucleotide and the effect of added salts.
J. biol. Chem., 242,2840-2846

DALZIEL,K. (1969): The interpretation of kinetic data for enzyme-catalysed reactions involving three substrates.
Biochem. J., 114,547-556

DAWSON,C.R. und W.B.TARPLEY (1951): Copper oxidases. Aus: J.SUMNER u. K.MYRBÄCK, The enzymes, Band II/1, New York, Academic Press

DE DUVE,C., R.WATTEAUX und P.BAUDHUIN (1962): Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. Adv. Enzymol., 24,291-358

DESSEN,P. und D.PANTALONI (1969): Glutamate déshydrogénase. Structure quaternaire et propriétés rotatoires. Europ. J. Biochem., 8,292-302

DE HAAN,E.H., J.M.TAGER und E.C.SLATER (1967): Factors affecting the pathway of glutamate oxidation in rat liver mitochondria. Biochim. biophys. Acta, 131,1-13

DELBRÜCK,A., E.ZEBE und T.BÜCHER (1959): Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung. Biochem. Z., 331,273-296

DETERMANN,H., (1967): Gelchromatographie. Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 204 S.

DIETZ,A.A. und T.LUBRANO (1967): Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc-electrophoresis. Analyt. Biochem., 20,246-257

DI JESO,F.,(1968): Ammonium sulfat concentration conversion nomograph for 0^{o}. J. biol. Chem., 243,2022-2023

DI PRISCO,G., M.BANAY-SCHWARTZ und H.J.STRECKER (1968): Glutamate dehydrogenase in nuclear and mitochondrial fractions of rat liver. Biochem. biophys. Res. Commun., 33,606-612

DIXON,M., (1953): The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem: J., 55,170-171

DRACH,P.,(1939): Mue et cycle d'intermue che les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Océanogr., Monaco, 19,103-391

DUCHâTEAU-BOSSON,G. und M.FLORKIN (1961): Change in intracellular concentration of free amino acids as a factor of euryhyalinity in the crayfish Astacus astacus. Comp. Biochim. Physiol., 3,245-249

EISENBERG,H. und G.M.TOMKINS (1968): Molecular weights of the subunits, oligomeric and associated forms of bovine liver glutamate dehydrogenase. J. mol. Biol., 31,37-49

FAHIEN,L.A., B.O.WIGGERT und P.P.COHEN (1965a): Crystallization and kinetic properties of glutamate dehydrogenase from frog liver. J. biol. Chem., 240,1083-1090

FAHIEN,L.A., B.O.WIGGERT und P.P.COHEN (1965b): Effect of nucleotides and coenzymes on frog liver glutamate dehydrogenase. J. biol. Chem., 240,1091-1095

FISHER,H.F., D.G.CROSS und L.L.McGREGOR (1962): Catalytic activity of subunits of glutamic dehydrogenase. Nature, 196,895-896

FLORKIN,M. und E.SCHOFFENIELS (1969): Molecular approaches to ecology. New York und London. Academic Press, 203 S.

FRIEDEN,C., (1959a): Glutamic dehydrogenase. II. The effect of various nucleotides on the association-dissociation and kinetic properties. J. biol. Chem., 234,815-820

FRIEDEN,C., (1959b): Glutamic dehydrogenase. III. The order of substrate addition in the enzymatic reaction. J. biol. Chem., 234,2891-2896

FRIEDEN,C., (1962a): The unusual inhibition of glutamate dehydrogenase by guanosine di- and triphosphate. Biochim. biophys. Acta, 59,484-486

FRIEDEN,C., (1962b): The molecular weight of chicken-liver glutamate dehydrogenase. Biochim. biophys. Acta, 62, 421-423

FRIEDEN,C., (1963a): Different structural forms of reversibly dissociated glutamic dehydrogenase: Relation between enzymatic activity and molecular weight. Biochem. biophys. Res. Commun., 10,410-415

FRIEDEN,C., (1963b): Glutamate dehydrogenase. V. The relation of enzyme structure on catalytic function. J. biol. Chem., 238,3286-3299

FRIEDEN,C., (1965): Glutamate dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleotide and other effects on the enzyme from various sources. J. biol. Chem., 240,2028-2035

GAULL,G., D.D.HAGERMAN und C.A.VILLEE (1960): Preparation and properties of glutamic dehydrogenase from human placenta. Biochim. biophys. Acta, 40,552-554

GRASZYNSKI,K., (1969): Intrazelluläre Lokalisation von Enzymen des Flußkrebses. Enzyme der Fettoxydation und des Ketonkörperstoffwechsels, Dehydrogenasen des energieliefernden Stoffwechsels und Proteasen der Mitteldarmdrüse. Z. vergl. Physiol., 66,107-122

GRAUBARD,M. und J.M.NELSON (1935a): Tyrosinase action on mono- and dihydric substances. J. biol. Chem., 111, 757-770

GRAUBARD,M. und J.M.NELSON (1935b): On the quantitative measurement of the enzyme tyrosinase. J. biol. Chem., 112,135-141

HERBERT,J.D., R.A.COULSON und T.HERNANDEZ (1966): Free amino acids in the caiman and rat. Comp. Biochim. Physiol., 17,583-598

KARLSON,P. und H.LIBENAU (1961): Zum Tyrosinstoffwechsel V. Reindarstellung, Kristallisation und Substratspezifität der o-Diphenoloxydase aus Calliphora erythrocephala. HOPPE-SEYLER's Z. physiol. Chem., 326,135-143

KLINGENBERG,M. und W.SLENCZKA (1959): Pyridinnucleotide in Leber-Mitochondrien. Eine Analyse ihrer Redox-Beziehungen. Biochem. Z., 331,486-517

KLINGENBERG,M. und D.PETTE (1962): Proportions of mitochondrial enzymes and pyridine nucleotides. Biochem. biophys. Res. Commun., 7,430-432

KUBO,H., T.YAMANO, M.IWATSUBO, H.WATARI, T.SOYAMA, J.SHIRAISHI, S.SAWADA und N.KAWASHIMA (1957): Sur l'interaction entre l'enzyme et le coenzyme dans le système de la déhydrogénase de l'acide glutamique et celui de l'oxydase des acides aminés. Proc. internat. Symp. Enz. Chem., Tokyo und Kyoto, 345-350

KUBO,H., T.YAMANO, M.IWATSUBO, H.WATARI, T.SOYAMA, J.SHIRAISHI, S.SAWASA, N.KAWASHIMA, S.MITANI und K.ITO (1958): Sur l'interaction entre l'enzyme et le co-enzyme dans le système de la déshydrogénase de l'acide glutamique et celui de l'oxydase des acides aminés. Bull. Soc. Chim. biol., 40,431-447

LANDRISCINA,C., S.PAPA, N.E.LOFRUMENTO, P.CORATELLI und E.QUAGLIARIELLO (1969a): Localizzazione enzimatica nelle frazioni submitocondriali die fegato di piccione.- I. Studio della glutammico deidrogenasi, della isocitrico deidrogenasi(NADP), degli enzimi della sintesi degli acidi grassi e della fosfopiruvico carbosilasi. Boll. Soc. Ital. Biol. sper., 44,2122-2127

LANDRISCINA,C., G.DE GREGORIO, G.PROCACCI, G.V.GNONI und E.QUAGLIARIELLO (1969b): Attivita enzimatiche nelle frazioni submitocondriali die cervello di bue. Boll. Soc. Ital. Biol. sper., 44,2131-2135

LAURENT,T.C. und J.KILLANDER (1964): A theory of gel filtration and its experimental verification. J. Chromatog., 14,317-330

LEHMANN,F.G. und G.PFLEIDERER (1969): Glutamat-Dehydrogenase aus menschlicher Leber. HOPPE-SEYLER's Z. physiol. Chem., 350,609-616

LéJOHN,H.B., (1968): On the involvement of Ca^{2+} and Mn^{2+} in the regulation of mitochondrial glutamic dehydrogenase from Blastocladiella. Biochem. biophys. Res. Commun., 32,278-283

LéJOHN,H.B., I.SUZUKI und J.A.WRIGHT (1968): Glutamate dehydrogenase of Thiobacillus novellus. Kinetic properties and a possible control mechanism. J. biol. Chem., 243, 118-128

LéJOHN,H.B., S.G.JACKSON, G.R.KLASSEN und R.V.SAWULA (1969): Regulation of mitochondrial glutamic dehydrogenase by divalent metals, nucleotides, and α-ketoglutarate. Correlations between the molecular and kinetic mechanism and the physiological implications. J. biol. Chem., 244, 5346-5356

LEUTHARDT,F., (1963): Lehrbuch der physiologischen Chemie. 15.Auflage Berlin, Walter de Gruyter & Co., 911 S.

LINEWEAVER,H. und D.BURK (1934): The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. chem. Soc., 56,658-666

LOCASCIO,G.A., H.A.TIGIER und A.M.DEL C.BATTLE (1969): Estimation of molecular weights of proteins by agarose gel filtration. J. Chromatogr., 40,453-457

LOWRY,O.H., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR und R.J.RANDALL (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem., 193,265-275

MAURER,R., (1968): Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Berlin, Walter de Gruyter, 221 S.

McALLAN,J.W. und W.CHEFURKA (1961): Properties of transaminases and glutamic dehydrogenase in the cockroach Periplaneta americana. Comp. biochem. Physiol., 3,1-19

MUUS,J., (1968): Gel electrophoresis of some dehydrogenases from flight muscles of tsetse flies (Glossina morsitans) and houseflies (Musca domestica). Comp. biochem. Physiol., 24,527-536

OLSON,J.A. und Ch.B.ANFINSEN (1952): The crystallization and characterization of L-glutamic acid dehydrogenase. J. biol. Chem., 197,67-79

OLSON,J.A. und Ch.B.ANFINSEN (1953): Kinetic and equilibrium studies on crystalline L-glutamic acid dehydrogenase. J. biol. Chem., 202,841-856

PASHEV,I.G., (1967): Effects of some inhibitors and acetylation on the electrophoretic pattern of glutamic dehydrogenase. Clin. chim. Acta, 18,355-359

PETTE,D., (1968): Aktivitätsmuster und Ortsmuster von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels. In: F.W.SCHMIDT (ed.): Praktische Enzymologie, Bern und Stuttgart, Verlag Hans Huber

POTTS,W.T.W. und G.PARRY (1964): Osmotic and ionic regulation in animals. Oxford, Pergamon Press, 423 S.

QUAGLIARIELLO,E., S.PAPA, C.SACCONE, F.PALMIERI und A.FRANCAVILLA (1965): The oxidation of glutamate by rat liver mitochondria. Biochem. J., 95,742-748

RESSLER,N. und K.STITZER (1967): Strach-gel investigations on the relationships between dehydrogenase proteins. Biochim. biophys. Acta, 146,1-9

RYBáK,M., Z.BRADA und I.M.HAIS (eds.) (1966): Säulenchromatographie an Cellulose-Ionenaustauschern. Jena, VEB Gustav Fischer, 531 S.

BACKTOR,B., (1961): The role of mitochondria in respiratory metabolism of flight muscle. An. Rev. Entomol., 6,103-130

SANWAL,B.D., (1961): Diphosphopyridine nucleotide and triphosphopyridine nucleotide linked glutamic dehydrogenase of Fusarium. Arch. Biochem. Biophys., 93,377-386

SANWAL,B.D. und M.LATA (1961/62): Effect of glutamic acid on the formation of two glutamic acid dehydrogenases of Neurospora. Biochem. biophys. Res. Commun., 6,404-409

SANWAL,B.D. und M.LATA (1962a): Concurrent regulation of glutamic acid dehydrogenases of Neurospora. Arch. Biochem. Biophys., 97,582-588

SANWAL,B.D. und M.LATA (1962b): The regulation of glutamic dehydrogenases and an antigenically related protein in amination deficient mutants of Neurospora. Arch. Biochem. Biophys., 98,420-426

SATO,T., (1957): Crystalline glutamic dehydrogenase and its physical properties. Osaka Daigaku Igaku Zasshi, 9, 949-958 (Referiert in: Chemical Abstracts, 52,4725 (1958))

SCHOFFENIELS,E., (1965): L-glutamic acid dehydrogenase in the gills of Palinurus vulgaris LATR.. Arch. internat. Physiol. Biochim., 73,73-80

SCHOFFENIELS,E., (1966): The activity of the L-glutamic acid dehydrogenase. Arch. internat. Physiol. Biochim., 74, 665-676

SEDGWICK,K.A. und C.FRIEDEN (1968): The molecular weight and some kinetic properties of crystalline rat liver glutamate dehydrogenase. Biochem. biophys. Res. Commun., 32,392-397

SHATILOV,V.R., Z.G.EVSTIGNEEVA und V.L.KRETOVICH (1969): Glutamate dehydrogenase in Chlorella. Biokhimiya, 34, 409-416

SNOKE,J.E., (1956): Chicken liver glutamic dehydrogenase. J. biol. Chem., 223,271-276

SOTTOCASA,G.L., (1967): Biochemical properties of inner and outer mitochondrial membranes of liver. Biochem. J., 105,1p-2p

SPECK,U. und K.URICH (1969): Das Schicksal der Nährstoffe bei dem Flußkrebs Orconectes limosus: Einbau von Glucose-U-^{14}C, Glutamat-U-^{14}C und Palmitat-U-^{14}C in die verschiedenen Stoffklassen. Z. vergl. Physiol., 63,395-404

STADTMAN,E.R., (1966): Allosteric regulation of enzyme activity. Adv. Enzymol., 28,41-154

STRUCK,J. und I.W.SIZER (1960): The substrate specifity of glutamic acid dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys., 86,260-266

SUND,H. und W.BURCHARD (1968): Sedimentation coefficient and molecular weight of beef liver glutamate dehydrogenase at the microgram and the milligram level. Europ. J. Biochem., 6,202-206

TAGER,J.M. und S.PAPA (1965): On the nicotinamide nucleotide specifity of glutamate dehydrogenase in rat-liver mitochondria. Biochim. biophys. Acta, 99,570-572

TALAL,N. und G.M.TOMKINS (1964): Allosteric properties of glutamate dehydrogenase from different sources. Science, 146,1309-1311

TOMKINS,G.M. und K.L.YIELDING (1961): Regulation of the enzymic activity of glutamic dehydrogenase mediated by changes in its structure. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol., 26,331-341

TOMKINS,G.M., K.L.YIELDING und J.CURRAN (1961): Steroid hormone activation of L-alanine oxidation catalyzed by a subunit of crystalline glutamic dehydrogenase. Proc. natl. Acad. Sci. U. S., 47,270-278

TOMKINS,G.M., K.L.YIELDING, N.TALAL und J.F.CURRAN (1963): Protein structure and biological regulation. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol., 28,461-471

URICH,K., (1967): Aminosäurestoffwechsel in den Organen des Flußkrebses Orconectes limosus: Transaminierung, oxydative und nicht oxydative Desaminierung. Z. vergl. Physiol., 56, 95-110

URICH,K., (1968): Die Biochemie der decapoden Crustaceen. Verh. Deutsch.zool.Ges. Innsbruck 1968. Leipzig; Geest & Portig K.G.

VAN DEN BERGH,S.G., (1967): Insect mitochondria. Aus COLOWICK, S. und N.KAPLAN, Eds.: ESTABROOK,R., und M.PULLMAN: Methods in enzymology X. New York und London, Academic Press

VAN DER HELM,H.J., (1962): L-glutamate dehydrogenase isoenzymes. Nature, 194,773

WALLENFELS,K., H.SUND und H.DIEKMANN (1957): Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden. IV. Hemmstoffe für DPN-abhängige Zinkenzyme. Biochem. Z., 329,48-58

WARBURG,O., und W.CHRISTIAN (1936): Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridinnucleotide). Biochem. Z., 287,291-328

WEILER,D.L., A.HEANEY und R.E.SJOGREN (1968): A simple apparatus and procedure for electrofocusing experiments: pI of lactate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase. Biochim. biophys. Acta, 168,576-579

WIGGERT,B.O., und P.P.COHEN (1965): Substrate specifity of crystalline frog liver glutamate dehydrogenase. J. biol. Chem., 240,4790-4792

WIGGERT,B.O.,und P.P.COHEN (1966): Comparative study of tadpole and frog glutamate dehydrogenases. J.biol.Chem., 241,210-216

WIEME,R.J., und RABAEY (1957): A new technique of quantitative ultramicroelectrophoresis. Naturwissenschaften, 44,112-113

WOLFF,J., (1962a): The effect of thyroxine on isolated dehydrogenases. II. Sedimentation changes in glutamic dehydrogenase. J. biol. Chem., 237,230-235

WOLFF,J., (1962b): The effect of thyroxine on isolated dehydrogenases. III. The side of action of thyroxine on glutamic dehydrogenase, the function of adenine and guanine nucleotides, and the relation of kinetic to sedimentation changes. J. biol. Chem., 237,236-242

WOLFF,J. und E.C.WOLFF, (1957): The effect of thyroxine on isolated dehydrogenases. Biochim. biophys. Acta, 26,387-396

YIELDING,K.L. und G.M.TOMKINS (1960): Structural alterations in crystalline glutamic dehydrogenase induced by steroid hormones. Proc. natl. Acad. Sci. U.S., 46,1483-1488

YIELDING,K.L. und G.M.TOMKINS (1961): An effect of L-leucine and other essential amino acids on the structure and activity of glutamic dehydrogenase. Proc. natl. Acad. Sci. U.S., 47,983-989

YIELDING,K.L., G.M.TOMKINS, M.W.BITENSKY und N.TALAL (1964): Reagent-induced changes in the structure and catalytic activity of glutamic dehydrogenase. Canad. J. Biochem., 42,727-743

YOUNES,A., R.DURAND und D.GAUTHERON (1967): Localisation intracellulaire de l'activité déshydrogénase glutamique dans le muscle cardiaque de porc. Compt. rend., Serie D, 265, 1834-1836

ZIEGLER,D.M. und A.W.LINNANE (1958): Studies on the electron transport system. XIII. Mitochondrial structure and dehydrogenase activity in isolated mitochondria. Biochim. biophys. Acta, 30,53-63

LEBENSLAUF

1.7.1943	Geboren in Berlin Eltern: Otto Beyer, Beruf: Laboringenieur Gertrud Beyer, geb.Paul, verstorben am 25.6.1967
1.9.1949	Einschulung in die 5. Grundschule zu Berlin
1.4.1955	Umschulung in die Robert-Blum-Schule, 2.O.W.Z. Berlin
31.3.1962	Bestehen der Reifeprüfung an dieser Schule
2.4.1962 - 25.4.1962	Arbeit als Hilfsarbeiter bei den Isophonwerken, Berlin-Tempelhof, Eresburgstr. 22
26.4.1962 - 30.9.1962	Arbeit bei Opel-Finkbeiner, Berlin-Steglitz, Albrechtstr.22, als Wagenpfleger

Am 1.10.1962 begann ich das Studium der Zoologie an der F.U. Berlin, dem ich mich dort ohne Unterbrechung bis jetzt widmete. Die Vordiplomprüfung bestand ich am 19.11.1965. Im Wintersemester 1967/68 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft am II. Zoologischen Institut der F.U. Anschließend wurden unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. K. Urich die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation begonnen. Nach der Beendigung der dazu notwendigen Untersuchungen nahm ich am 15.10.1969 eine Stelle als wissenschaftlicher Assistent im Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes an, die ich derzeit noch innehabe.

Meine akademischen Lehrer waren in Zoologie die Professoren Belitz, Brandenburg, Görner, Günther, Kemper, Kümmel, Peus, Ulrich, Urich und Wolf, in Botanik die Professoren Thielke, Eckardt, Küster und Reinert, in Genetik Professor Lüers, in Chemie die Professoren Gnichtel, Jahr, Lautsch, Plieth und Vetter, in Physik die Professoren Lassen und Stein und in Mathematik Professor Ueberreiter.

BAMBERGER FOTODRUCK · RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG · Pödeldorferstr. 88 Telefon 0951/31299